



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO PRELIMINAR PARA A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA DAS INFILTRAÇÕES  
INTRA-ARTICULARES COM ESTANOZOLOL EM CANÍDEOS COM DOENÇA  
DEGENERATIVA ARTICULAR E A SUA RELAÇÃO COM A INTERLEUCINA-1 $\beta$  SÉRICA

João Maria Aires Rebelo Cotta

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves Gil

Dr. Pedro Ricardo Almeida Santos Azevedo

ORIENTADOR

Dr. Pedro Ricardo Almeida Santos Azevedo

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Miguel Alves Carreira

2016

LISBOA

---









UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO PRELIMINAR PARA A AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA CLÍNICA DAS INFILTRAÇÕES  
INTRA-ARTICULARES COM ESTÁNOZOLOL EM CANÍDEOS COM DOENÇA  
DEGENERATIVA ARTICULAR E A SUA RELAÇÃO COM A INTERLEUCINA-1 $\beta$  SÉRICA.

João Maria Aires Rebelo Cotta

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves Gil

Dr. Pedro Ricardo Almeida Santos Azevedo

ORIENTADOR

Dr. Pedro Ricardo Almeida Santos Azevedo

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Miguel Alves Carreira

2016

LISBOA

---



## **Agradecimentos**

O meu maior agradecimento é dirigido à minha família, nomeadamente aos meus pais por sempre terem acreditado em mim, e por durante estes anos terem sido uma fonte de estabilidade e apoio sem a qual não teria alcançado este e outros objetivos. À Catarina por todos os conselhos e suporte incondicional que sempre me deu e de que poucos se podem gabar, e ao Duarte pela cumplicidade de irmão e por enriquecer a família com a sua autenticidade.

Agradeço à Andreia pela infindável compreensão, cumplicidade e conforto, e por todo o apoio sem o qual tudo teria sido mais difícil. Obrigado também aos Srs. Paulo e Esperança Afonso por durante este tempo terem sido compreensivos com o facto de eu lhes “roubar” a Andreia.

Ao Professor Miguel Carreira pelos imensos conhecimentos, métodos e ferramentas de trabalho que me transmitiu, o que apenas foi possível graças ao seu estímulo e dedicação. Obrigado também pela confiança que sabe transmitir, e pela amizade que sempre manifestou.

Ao Doutor Pedro Azevedo do CMVAA por ter aceitado orientar o meu estágio, pelas diversas e valiosas aprendizagens que me proporcionou e pelo seu exemplo de profissionalismo. Obrigado pelo apoio, pelo companheirismo e pela amizade que nunca esquecerei.

Às Doutoras Alexandra Costa e Eva Mendes pelos momentos de aprendizagem que muito valorizo, assim como a sua amizade e apoio constantes durante o estágio curricular.

À ALS ControlVet pelo suporte e financiamento das análises laboratoriais que constam no estudo experimental, à Doutora Vanessa Ralha do departamento de Patologia Clínica por todas as sugestões e assistência e ainda ao José Duarte do departamento de Imunologia pelo compromisso e competência que demonstrou durante a sua ajuda na realização do protocolo laboratorial.

Agradeço a todos os colegas que me acompanharam ao longo do curso, de quem fiz amigos, e que tornaram estes anos inesquecíveis. Obrigado Joséca, Lalanda, Bruno, Alex, Sara, Gabriel, Raquel, Zé Ricardo, Catarina, Bruna, Gabriela, Eloy, Gonçalo, Maria, Pedro e todos os outros. Acreditem que a memória destes tempos me irá acompanhar para sempre, e que já os recordo com nostalgia. Um obrigado especial ao Coucelo por toda a partilha, por todos os conselhos e pela camaradagem que irá para sempre perdurar.

Agradeço a todos os Professores que contribuíram para a minha formação, esperando vir a estar à altura da sua dedicação e compromisso.

Obrigado a todos os meus amigos de Tondela que representam uma extensão da minha família nas horas boas e também nas mais difíceis. Vocês sabem quem são.

Seria impossível deixar de agradecer ao meu cão, Igor, responsável por reacender a minha paixão de infância pela Medicina Veterinária. As infelizes circunstâncias da tua partida fizeram de ti a maior fonte de motivação que um Médico Veterinário poderia ter, mas isso eu não agradeço, porque preferia ter te aqui. Agradeço também ao Rex a quem devo a ligação que hoje sinto com cães e todos os animais, e à Tai cujos exemplos de superação e perseverança me inspiram diariamente.



# ESTUDO PRELIMINAR SOBRE A EFICÁCIA CLÍNICA DO ESTANOZOLOL EM INFILTRAÇÕES INTRA-ARTICULARES EM CANÍDEOS COM DOENÇA DEGENERATIVA ARTICULAR E A SUA RELAÇÃO COM OS NÍVEIS DE INTERLEUCINA-1 $\beta$ SÉRICA.

## Resumo

O presente estudo foi desenvolvido numa amostra de 20 indivíduos adultos da espécie *Canis familiaris* (n=20), e teve como objetivos avaliar a eficácia clínica do Estanozolol, (um esteroide anabólico-androgénico) em infiltrações intra-articulares em canídeos diagnosticados com doença degenerativa articular (DDA), e estabelecer a sua relação com os níveis de IL-1 $\beta$  sérica ([IL-1 $\beta$ ]) a qual tem um papel de relevo na componente inflamatória da DDA. A amostra foi dividida em 2 grupos: indivíduos saudáveis (GS, n=13) e indivíduos com DDA (GDDA, n=7). O GDDA foi sujeito a uma infiltração no joelho com estanozolol na dose de 0,3 mg/Kg. Foram considerados 4 momentos diferentes: T0 (dia da realização da infiltração intra-articular), T1 (4º dia após infiltração), T2 (8º dia após infiltração) e T3 (23º dia após infiltração), para a avaliação da eficácia do tratamento. Foram colhidas amostras de sangue periférico em T0 e T2 no GDDA, e em T0 no GS para quantificação da [IL-1 $\beta$ ], utilizando um método ELISA validado para canídeos (RAB0572-1KT, Sigma-Aldrich®). Também foram realizadas radiografias em duas projeções aos joelhos do GDDA em T0 e T3.

Os resultados obtidos indicaram a presença de diferenças estatisticamente significativas entre GS e GDDA para a idade ( $p<0,00$ ); e para o nível de efusão articular presente no GDDA em T2 ( $p<0,00$ ). O GDDA apresentou valores de [IL-1 $\beta$ ] sérica superiores aos do GS, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,20$ ). No GDDA a [IL-1 $\beta$ ] em T0 foi superior à [IL-1 $\beta$ ] em T2, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,56$ ). Foi possível concluir que o nível de dor à manipulação articular reduziu de forma significativa em T2 ( $p=0,02$ ), mantendo-se ainda significativamente inferior em T3 ( $p=0,03$ ). Existe uma correlação positiva entre o nível de dor e a [IL-1 $\beta$ ] nos canídeos com DDA ( $r=0,61$ ;  $p=0,04$ ).

**Palavras-chave:** Canídeos, Doença degenerativa articular, Estanozolol, Infiltração intra-articular, Interleucina-1 $\beta$ .



# **PRELIMINARY STUDY FOR THE CLINICAL EFFICACY OF INTRA-ARTICULAR STANOZOLOL INFILTRATIONS IN DOGS WITH DEGENERATIVE JOINT DISEASE, AND ITS RELATIONSHIP WITH SERUM INTERLEUKIN-1 $\beta$ LEVELS**

## **Abstract**

This study was developed in a sample of 20 adult dogs ( $n=20$ ), and aimed to evaluate the clinical efficacy of Stanazolol (an anabolic-androgenic steroid) intra-articular infiltrations in dogs with degenerative joint disease (DJD) diagnosed, and its relationship with the serum IL-1 $\beta$  levels ([IL-1 $\beta$ ]) which plays a major role in the DJD's inflammatory process. The sample was divided into 2 groups: healthy individuals (HG,  $n=13$ ) and patients with DJD (DJDG,  $n=7$ ). The DJDG was submitted to a knee infiltration with Stanazolol at a dose of 0.3 mg/kg. Four different times points were considered for the evaluation of treatment effectiveness: T0 (the day of the intra-articular infiltration), T1 (4<sup>th</sup> day after infiltration), T2 (8<sup>th</sup> day after infiltration) and T3 (23<sup>rd</sup> day after infiltration). At T0 and T2, peripheral blood samples were taken for the measurement of the [IL-1 $\beta$ ] with an ELISA method validated for the specie (RAB0572-1KT, Sigma-Aldrich®). Digital radiographs to the knees of DJDG were taken in two projections at T0 and T3. Statistically significant differences were registered between HG and DJDG for age ( $p<0.00$ ); and for the decreasing of joint effusion level in DJDG at T3 ( $p<0.00$ ). DJDG presented higher [IL-1 $\beta$ ] levels than HG, but no statistically significant differences were registered ( $p=0.20$ ). In DJDG the [IL-1 $\beta$ ] levels in T0 were higher than at T2, but also, no statistically significant differences were registered ( $p=0.56$ ). It was possible to conclude that the pain level at joint manipulation was significantly reduced in T2 ( $p=0.02$ ), remaining significantly lower at T3 ( $p=0.03$ ). There was a positive correlation between pain level and the [IL-1 $\beta$ ] found in DJDG ( $r=0.61$ ;  $p=0.04$ ).

**Keywords:** Dog; Degenerative joint disease; Stanazolol; Intra-articular infiltration; Interleukin-1 $\beta$ .



## Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice	viii
Lista de Gráficos	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Imagens	ix
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
Lista de Símbolos	xi
I- Relatório de Atividades de Estágio	1
II- Revisão Bibliográfica	6
1- A Unidade Anatômica Articular	6
1.1- Cartilagem Articular	7
1.1.1- Embriogénese e Histogénese da Cartilagem Articular	7
1.1.2- Colagénio	8
1.1.3- Substância Fundamental	10
1.1.4- Organização da Matriz Extracelular	13
1.1.5- Interações e Biomecânica do Binómio Condrócitos – Matriz	16
1.2- Cápsula Articular	18
1.3- Líquido Sinovial	19
1.4- Ligamentos, Meniscos e Almofadas Adiposas Articulares	20
2- Patologia das Articulações Sinoviais	21
2.1- Doenças Articulares Inflamatórias	23
2.2- Doenças Articulares Não Inflamatórias	23
2.2.1- Doença Degenerativa Articular	23
2.2.1.1- Factores Predisponentes	24
2.2.1.2- A Fisiopatologia da DDA	26
2.2.1.3- A Bioquímica da DDA	28
2.2.1.4- O Fenómeno da Dor na DDA	33
3- O Doente com DDA: Diagnóstico Clínico e Complementar	33
3.1- O Diagnóstico Clínico	34
3.2- Exames Complementares de Diagnóstico	35
1) Radiografia	35
2) Artrografia	37
3) Tomografia Computorizada	37
4) Ressonância Eletromagnética	37
5) Ultrassonografia	37
6) Ultrassonografia	37
7) Cintigrafia	38
8) Atrocentese	38
4- A Terapêutica da DDA	39
4.1- Fatores Ambientais e Reabilitação Física	39
4.2- Nutracêuticos	40
1) Sulfato de Condroitina	40
2) Glucosamina	40
3) Ácidos Gordos Essenciais	41
4) Mexilhão dos Lábios Verdes	41
4.3- Terapia Medicamentosa sistémica	42
4.3.1- Fármacos Moduladores de Sintomatologia	42
1) Anti-Inflamatórios Não Esteróides (AINEs)	43
2) Corticoesteroides	43

3) Adjuvantes Analgésicos	45
4.3.2- Agentes Moduladores das Alterações Estruturais	46
1) Ácido Hialurónico	46
2) GAGs Polisulfatados	46
3) Polisulfato de Pentosano	47
4.4- Tratamento Cirúrgico da DDA	47
4.5- Terapias Locais Infiltrativas	47
4.5.1- Técnica de Artrocentese	48
4.5.2- Fármacos de Utilização Intra-Articular	49
4.5.3- Outros Fármacos para Terapias Infiltrativas	51
5- O Estanozolol	51
III- Estudo Experimental	57
1-Materiais e Métodos	57
1.1- Justificação do Trabalho Experimental	57
1.2- Objectivos	57
1.3- Amostra	58
1.4- Desenho Experimental	58
2- Resultados	62
2.1- Caracterização da Amostra	62
2.2- Concentração da IL-1 $\beta$ Sérica	64
2.3- Opinião dos Proprietários	66
2.4- Avaliação Clínica	68
3- Discussão de Resultados	74
IV- Bibliografia	80
V- Anexos	89

## Lista de Gráficos

Gráfico 1- Concentrações de IL-1 $\beta$ (pg/mL) do grupo de indivíduos saudáveis.	65
Gráfico 2- Concentrações séricas médias de IL-1 $\beta$ no grupo de doentes com DDA nos diferentes pontos.	65
Gráfico 3- Variação das concentrações de IL-1 $\beta$ (pg/mL) no GDDA.	65
Gráfico 4- Opinião dos proprietários acerca da intensidade da dor.	67
Gráfico 5- Opinião dos proprietários acerca da interferência da dor na função.	67
Gráfico 6- Dor Articular à Manipulação.	69
Gráfico 7- Interferência da dor com a função (avaliação clínica).	70
Gráfico 8- Variação de temperatura transcutânea articular média e temperatura retal média entre T0 e T1 (°C).	73
Gráfico 9- Frequência Relativa de Casuística de Patologia Médica, Cirúrgica e Medicina Preventiva.	89
Gráfico 10- Frequência Relativa de Casuística de Patologia Médica, Cirúrgica e Medicina Preventiva.	89
Gráfico 11- Frequência Relativa de Espécies na Casuística de Medicina Interna, Patologia Cirúrgica e Medicina preventiva (%).	90
Gráfico 12- Frequência Relativa de Espécies nas Diferentes Áreas da Patologia Médica.	91
Gráfico 13- Frequência Relativa das Diferentes Espécies de Pacientes na Casuística de Patologia Cirúrgica.	92
Gráfico 14- Frequência Relativa das Diferentes Espécies de Pacientes pela Casuística de Medicina preventiva (%).	92
Gráfico 15- Frequência Relativa das Diferentes Espécies de Pacientes na Casuística de Imagiologia (%).	93

## Lista de Tabelas

Tabela 1- Amplitudes articulares caninas normais.	35
Tabela 2- Contagens celulares diferenciais do líquido sinovial fisiológico e de articulações patológicas.	38
Tabela 3- Classes de fármacos e sua eficácia no bloqueio das etapas fisiológicas da percepção de dor.	46
Tabela 4- Distribuição de atividades pelos diferentes pontos temporais (GDDA).	59
Tabela 5- Descrição da amostra do grupo de cães com DDA.	63
Tabela 6- Descrição da amostra do grupo de controlo.	63
Tabela 7- Concentração de IL-1 $\beta$ (pg/mL) no grupo de doentes com DDA.	64
Tabela 8- Concentração de IL-1 $\beta$ (pg/mL) no grupo de controlo.	64
Tabela 9- Variação das concentrações de IL-1 $\beta$ (pg/mL) no grupo de doentes com DDA.	65
Tabela 10- Opinião dos proprietários em relação a cada paciente nos diferentes pontos temporais.	66
Tabela 11- Avaliação clínica de cada paciente nos diferentes pontos temporais.	68
Tabela 12- Correlação de concordância (método de Lin) entre a opinião de proprietários em relação ao nível de dor e a dor à manipulação articular.	69
Tabela 13- Correlação de concordância (método de Lin) entre a opinião de proprietários e clínicos em relação à influência da dor na função.	70
Tabela 14- Correlação de concordância (método de Lin) entre a opinião de proprietários e clínicos em relação à qualidade de vida.	70
Tabela 15- Tipo de claudicação apresentado nos diferentes pontos temporais.	71
Tabela 16- Avaliação radiográfica de cada (3 avaliadores).	72
Tabela 17- Temperatura transcutânea articular e retal nos diferentes pontos temporais (°C)-.	73

## Lista de Imagens

Imagem 1- Radiografia latero-lateral do joelho de um canídeo com DDA.	36
Imagem 2- Artroscopia.	37

## Lista de Figuras

Figura 1- Esquematização de um corte sagital de uma articulação sinovial (joelho)	7
Figura 2- Estrutura do Agrecano	11
Figura 3- Estrutura da Decorina	12
Figura 4- Estrutura do Sindecano	12
Figura 5- Representação da organização da cartilagem hialina	13
Figura 6- Esquematização da organização das zonas da cartilagem hialina	14
Figura 7- Regiões da matriz cartilágnea	15
Figura 8- Organização da membrana sinovial	18
Figura 9- Reparação das lesões superficiais da cartilagem articular	22
Figura 10- Reparação das lesões profundas da cartilagem articular que alcancem o osso subcondral	22
Figura 11- Ácidos gordos polinsaturados (linoleico e $\alpha$ -linolénico)	41
Figura 12- Etapas fisiológicas da percepção de dor	43
Figura 13- Esquematização simplificada da cascata do ácido araquidónico	45
Figura 14- Artrocentese do carpo, tarso, joelho, cotovelo e ombro	49
Figura 15- Conversão enzimática da testosterona, e afinidade dos respectivos derivados	52
Figura 16- Estrutura da Testosterona	53
Figura 17- Estrutura do Estanozolol	53

## Lista de Abreviaturas e Siglas

5-HPETE	Ácido 5-hidroperoxieicosatetroeinoico
AA	Ácido Araquidónico
ADAMTs	Adamalisinases
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AH	Ácido Hialurônico
AINEs	Anti-Inflamatórios Não Esteróides
ALT	Alanina-Aminotransferase
ANA	Anticorpos Antinucleares
AINEs	Anti-Inflamatórios Não Esteróides
bFGF	Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos
BMP	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
CMVAA	Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis
COX	Cicloxigenases
COX-1	Cicloxigenase 1
COX-2	Cicloxigenase 2
DHT	5 $\alpha$ -dihidrotestosterona
EAA	Esteroides Anabólico-Androgénicos
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FGF-2	Fator de Crescimento de Fibroblastos 2
FSH	Hormona Estimulante Folicular
GAGs	Glicosaminoglicanos
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GH	Hormona do Crescimento
ICE	Enzima de Conversão da Interleucina 1 $\beta$
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IFN- $\gamma$	Interferão $\gamma$
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-11	Interleucina 11
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-1Ra	Antagonista do Receptor de IL-1
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
LH	Hormona Luteinizante
LOX	Lipoxigenases
LIF	Fator Inibidor de Leucócitos
LTA <sub>4</sub>	Leucotrieno A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	Leucotrieno E <sub>4</sub>
ME	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinases
MMP-1	Colagenase 1
MMP-2	Gelatinase A



MMP-3	Estromelisinina 1
MMP-8	Colagenase 2
MMP-9	Gelatinase B
MMP-13	Colagenase 13
MMP-14	Metaloproteinase Membranária do tipo I
NMDA	N-metil-d-aspartato
ON	8
OSM	Oncostatina M
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub> α	Prostaglandina F <sub>2</sub> α
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
RA	Receptores Androgénios
RE	Receptores Estrogénios
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
ROM	Amplitude de Movimento
RLCC	Ruptura de Ligamento Cruzado Cranial
SMNF	Sistema Mononuclear Fagocitário
SNC	Sistema Nervoso Central
SLRPs	Pequenos Proteoglicanos Ricos em Leucina
SZP	Proteína da Zona Superficial
TACE	Enzima de Conversão do Factor Necrosante Tumoral α
TGF	Factor de Transformação do Crescimento
TIMPs	Inibidores Tecidulares das Metaloproteinases
TNF	Factor Necrosante Tumoral
TNFR	Receptor do Factor Necrosante Tumoral
VIH	Vírus da Imunodeficiência Hereditária

### Lista de Símbolos

α	Alfa
β	Beta
μ	Mu
δ	Delta
γ	Gamma
%	Porcentagem
<	Inferior
>	Superior
=	Igual
±	Mais ou menos
°C	Graus Celsius
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
G	Gauge
μm	Micrómetro
mm	Milímetro
mL	Mililitro
nM	Nanometro
pg	Picograma
mmHG	Milímetro de mercúrio
kD	Quilo Dalton
n	Amostra
Pc	Coeficiente de correlação de concordância
r	Coeficiente de correlação
p	Nível de significância estatística



## **I - Relatório de Atividades de Estágio**

No âmbito do 6º ano do curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, tive a oportunidade de realizar um estágio curricular no Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis (CMVAA) sobre Orientação do Doutor Pedro Azevedo e Co-orientação do Professor Doutor Miguel Carreira. O estágio decorreu no período compreendido entre Setembro de 2014 a Março de 2015, com o horário de Segunda a Sexta-feira entre as 10:00h e as 21:30h com pausa das 13:00h às 15:00h, e de igual forma ao Sábado com a diferença que o período da tarde finalizava às 18:30h; perfazendo um total de 1881 horas de exposição à prática clínica nas diferentes áreas de trabalho em Animais de Companhia e Exóticos. Durante este período tive a oportunidade de ampliar, aplicar e sedimentar os conhecimentos adquiridos na faculdade numa constante experiência de aprendizagem. Os diferentes casos e atividades abrangeram as áreas Generalista e de Especialidades da Patologia Médica e Patologia Cirúrgica, mas também na área da Medicina Preventiva, Medicina Laboratorial, Medicina de Imagem e Gestão de Stocks. Durante o período de estágio tive ainda a possibilidade de compreender melhor as relações interpessoais quer com os proprietários dos doentes quer com os colegas de estágio. Cerca de 70% dos pacientes avaliados foram canídeos, 25% felídeos e 5% outros animais, onde foram incluídas espécies exóticas como lagomorfos, roedores, aves ornamentais e quelónios. Cerca de 53% dos pacientes representaram casos de Medicina Interna e de especialidades como Ortopedia, Dermatologia e Medicina de Exóticos, 31% de Medicina Preventiva e 16% de Patologia Cirúrgica. Encontram-se disponíveis em anexo representações gráficas da estatística descritiva relativa à casuística acompanhada (Anexo 1).

### **Medicina Interna e Internamento**

A exposição a casos clínicos de animais de companhia e exóticos teve por base a casuística diária acompanhada a nível das consultas externas, urgências médicas e os doentes em internamento. Foi possível aprender e praticar diversos procedimentos e técnicas necessárias ao exercício médico como, por exemplo a contenção de pacientes, a preparação e administração de medicamentos, a realização do exame de estado geral, oftalmológico, ortopédico e neurológico, tratamento de feridas, mudança de pensos, punções venosas, cateterizações e colheita de amostras biológicas sempre sobre supervisão de um Médico Veterinário da equipa do CMVAA. Foram ainda trabalhados aspectos como palpações abdominais, avaliação do pavilhão auricular de cães e gatos, e da cavidade oral de roedores e lagomorfos. Por diversas vezes procedi à monitorização de animais em estado crítico, realização de suporte avançado de vida, nebulizações

terapêuticas e sessões de fisioterapia com laser médico e eletroestimulação. No Internamento médico as funções ao longo do estágio também incluíram a monitorização e medicação diárias dos internados, e ainda os cuidados de sanidade e higienização garantindo que os mesmos se encontravam confortáveis. A casuística desta área correspondeu a cerca de 69% de canídeos, 24% de felídeos e 7% de outras espécies, distribuídos da seguinte forma pelas diferentes áreas de conhecimento:

- Gastroenterologia 15%;
- Dermatologia 14%;
- Ortopedia e Traumatologia 12%;
- Nefrologia e Urologia-8%;
- Otorrinologia-7%;
- Neurologia 7%;
- Oncologia 7%;
- Cardiologia 5%;
- Pneumologia 5%;
- Oftalmologia 4%;
- Hematologia e Doenças Infecciosas 3%;
- Reprodução e Obstetrícia 3%;
- Medicina Dentária 3%;
- Toxicologia 2%;
- Endocrinologia 1%;
- Outros Casos 4%.

Além dos exercícios permitidos pela experiência da casuística real, por diversas vezes foram elaborados desafios adicionais pela equipa de Médicos Veterinários residentes no sentido de praticar a prescrição protocolar medicamentosa para determinados quadros clínicos, bem como sugerir possíveis diagnósticos ou exames complementares. Ao longo do estágio também tive a possibilidade de realizar diversas apresentações científicas orais para toda a equipe profissional e de estagiários do CMVAA sobre temas da área da Medicina Interna.

### **Patologia Cirúrgica**

Durante praticamente todos os dias foi possível participar direta ou indiretamente na realização de procedimentos cirúrgicos na categoria de cirurgião júnior, circulante ou anestesista. Enquanto cirurgião júnior prestei assistência durante as diferentes fases da cirurgia ao cirurgião sénior responsável, realizando a limpeza do campo cirúrgico, fixando e

segurando estruturas anatómicas e instrumentação, participando na realização de diferentes suturas, fixação de implantes ortopédicos e todos os procedimentos solicitados.

Na condição de circulante era responsável pela preparação e seleção prévia de todo o material necessário à cirurgia, auxiliar na preparação dos cirurgiões, fornecer toda a instrumentação necessária durante o procedimento, preparar a *box* para o recobro do paciente, e por vezes realizar pensos e infiltrações anestésicas intra-lesionais em suturas previamente ao recobro.

As minhas funções no papel de anestesista incluíam a preparação da pré-medicação, protocolos medicamentosos e material necessário à indução. Realizei intubações e extubações dos doentes, e a monitorização anestésica peri-operatória que compreendia o período desde a indução até ao recobro do paciente, feita com base em medições multiparamétricas fornecidas por monitores de cirurgia e pela auscultação.

O conjunto de todas as cirurgias ao longo do estágio traduziu-se numa experiência acumulada de cerca de 40 horas de monitorização anestésica. Após cada cirurgia também realizei o acompanhamento do pós-operatório e da evolução dos pacientes, tendo presenciado e participado na remoção de suturas, drenos, avaliação de processos de ossificação, da integridade de estruturas e da cicatrização de lesões.

Os canídeos representaram cerca de 57% da casuística de patologia cirúrgica, os felídeos 35% e os restantes animais 8%. A distribuição pelos diferentes tipos de cirurgias foi a seguinte:

- Teriogenologia 47%;
- Ortopedia e Traumatologia 10%;
- Cirurgia Geral de Tecidos Moles 10%;
- Medicina Dentária 10%;
- Oncologia 9%;
- Pequena Cirurgia 7%;
- Gastroenterologia 3%;
- Oftalmologia 2%;
- Neurocirurgia 1%;

Por vezes foi possível a realização de alguns procedimentos mais simples e rápidos com total autonomia, mas com supervisão constante de um Médico Veterinário do CMVAA, e sempre tendo em conta a superior importância do bem-estar dos pacientes. Esses procedimentos incluíram a orquiectomia de gatos, exérese de pequenos nódulos e uma ovariectomia de uma cadela. Ainda no âmbito da cirurgia foi possível adquirir conhecimentos acerca de todo o ciclo envolvendo a lavagem, organização e

acondicionamento de instrumentação, batas e panos de campo, para posterior esterilização e reutilização.

### **Medicina Preventiva**

Cerca de 86% da casuística observada neste âmbito foram consultas para vacinação profilática, 7% para identificação electrónica (7%) e outros 7% consultas de informação designada no CMVAA como Consulta Informativa ou Inaugural, para novos proprietários de animais. O estágio permitiu sedimentar e aprofundar os conhecimentos acerca de aspectos legais da detenção de animais de companhia, e também de protocolos vacinais de cães, gatos e leporídeos, tendo sido realizados exercícios de preenchimento de boletins de vacinação e discussões acerca de diversos protocolos vacinais e de desparasitação.

### **Medicina Laboratorial**

Durante cerca de 4 semanas fiquei responsável pelo funcionamento do laboratório do CMVAA assumindo tarefas como o processamento e conservação de amostras, realização de urianálises, coprologias, bioquímicas sanguíneas, sorologias, culturas fúngicas (DTM), preenchimento de requisições para análises externas e registo de resultados em formato digital. Além destas funções fui também o responsável pela realização da bateria de exames pré-cirúrgicos de cada paciente, pela gestão de *stocks* dentro do laboratório e ainda por garantir a arrumação e o correto funcionamento dos equipamentos. Apesar deste período de maior responsabilidade e permanência no laboratório, as atividades neste departamento estenderam-se a todo o estágio o que permitiu familiarizar-me com os métodos de colheita, processamento e conservação de todo o tipo de amostras, interpretação dos resultados da medicina laboratorial em função dos diferentes quadros clínicos, avaliação de esfregaços sanguíneos, coprologias e sedimentos urinários. Por vezes foi solicitado pelos Médicos Veterinários que fizesse a explicação dos resultados da Medicina Laboratorial aos proprietários

### **Imagiologia**

Cerca de 84% dos casos de imagiologia correspondeu a exames radiográficos simples e também alguns exames de contraste, nomeadamente trânsitos baritados e mielografias. A ultrassonografia surge como o segundo exame de imagem mais frequente representando 15% do total, e 1% diz respeito a ecocardiografias. À semelhança do laboratório a determinada altura fiquei responsável pela Imagiologia durante cerca de 3 semanas, desempenhando funções como a preparação e seleção de constantes no equipamento de radiologia e ultrassonografia, posicionamento e contenção de pacientes, disparo do raio-x, revelação de imagens e posterior registo das mesmas em formato digital. Por vezes também

foi solicitado pelos Médicos Veterinários que fosse feita a explicação das imagens aos proprietários. A realização de algumas destas funções e o auxílio à realização de exames de imagem estenderam-se a todo o estágio, bem como a interpretação de todas as imagens capturadas nesse período. Por uma vez foi-me permitida a realização de parte de um exame abdominal ultrassonográfico a um paciente internado, sob supervisão de clínicos do CMVAA. Também foram avaliadas radiografias e tomografias computadorizadas externas, nomeadamente no contexto de consultas de referência ortopédicas.

## **II- Revisão Bibliográfica**

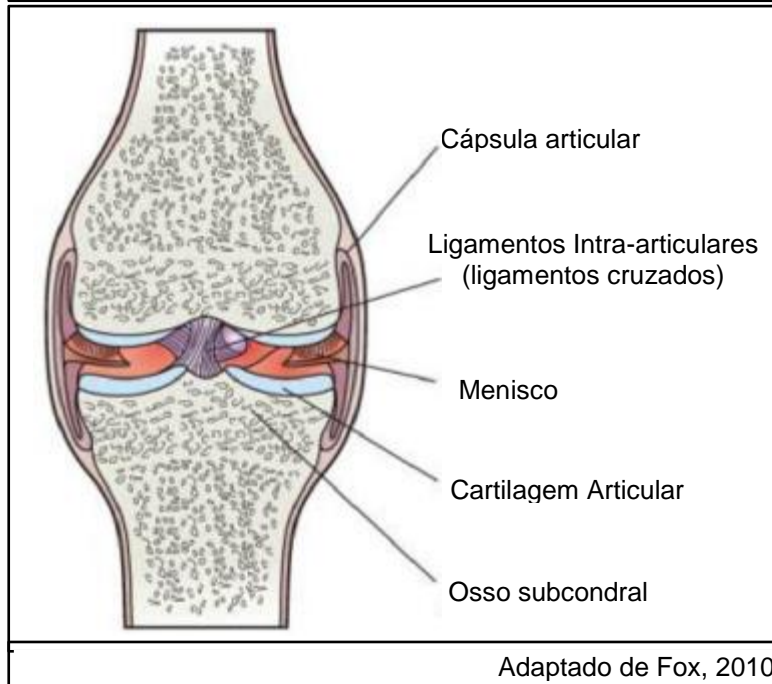
### **1- A Unidade Anatômica Articular**

Uma articulação consiste na reunião de dois ou mais ossos ou cartilagens por intermédio de outros tecidos, principalmente através de tecido fibroso e cartilaginoso, ou por uma mistura de ambos (Getty, 1982). A sua função é conferir estabilidade, flexibilidade e mobilidade às estruturas anatómicas (Tartaglia & Waugh, 2005), assim como absorver a energia resultante de impactos físicos (Weisbrode, 2007). A mobilidade permitida à sua estrutura anatómica é condicionada pelo tipo de articulação presente, sendo que em algumas situações estas formam uma cavidade articular (diartrose), enquanto outras não apresentam qualquer espaço (sinartrose) (Konig, 2004). As diartroses, também designadas de articulações sinoviais, são as articulações de maior complexidade estando presentes no esqueleto axial e apendicular (Weisbrode, 2007). Apresentam sempre coeficientes de atrito muito baixos e permitem uma grande amplitude de movimentos, sendo frequentemente designadas de articulações verdadeiras ou móveis (Weisbrode, 2007; Getty, 1982). Podem ser simples (quando possuem apenas duas superfícies articulares) ou compostas (quando apresentam mais de duas superfícies articulares) (Getty, 1982) e possuem uma cavidade articular preenchida por líquido sinovial produzido pela cápsula articular (Weisbrode, 2007). As superfícies ósseas articulares são formadas pelo chamado osso subcondral que consiste num osso denso distinto do osso cortical comum (Getty, 1982), e cujas funções são além de sustentar a cartilagem, dissipar as forças de choque para o osso cortical adjacente. A espessura da placa óssea subcondral varia em proporção com a força que sustenta (Weisbrode, 2007).

Algumas diartroses possuem estruturas adicionais dentro da cavidade articular que facilitam a sua função, como por exemplo ligamentos intra-articulares que estabilizam o movimento, e os meniscos e almofadas adiposas que absorvem os impactos e protegem a cartilagem hialina articular (Tartaglia & Waugh, 2005). Um suporte adicional também pode ser fornecido por ligamentos e tendões extra-articulares (Shulz, 2013).



Figura 1- Esquemática de um corte sagital de uma articulação sinovial (joelho).



### 1.1- A Cartilagem Articular

A superfície articular das diartroses é revestida por um tecido denominado de cartilagem hialina com cerca de 1 a 5 cm de espessura (Schulz, 2013), sendo as articulações sujeitas a maior tensão e fricção aquelas onde esta espessura é superior. A profundidade da cartilagem pode também variar ao longo da mesma articulação, apresentando-se menos espessa no centro quando a superfície articular é côncava, e na periferia quando a superfície é convexa (Getty, 1982).

As funções desta cartilagem são facilitar o movimento de deslize articular, distribuir as cargas físicas pelas superfícies articulares e absorver os choques durante a locomoção minimizando assim as lesões provocadas no osso subcondral. Contrariamente a outros tipos de cartilagem, a articular não possui pericôndrio (Junqueira e Carneiro, 2004b) e a sua nutrição é feita pelo líquido sinovial através de mecanismos de difusão, e também, em menor escala, a partir de vasos subcondrais (Weisbrode, 2007).

#### 1.1.1- Embriogênese e Histogênese da Cartilagem Articular

A cartilagem mais abundante no organismo é a do tipo hialino, formando o primeiro esqueleto do embrião que posteriormente sofre ossificação (Bacha, 2000).

À semelhança dos restantes tipos de tecido conjuntivo, a cartilagem hialina deriva do tecido mesenquimatoso, também designado por tecido conjuntivo embrionário, que por sua vez descende da mesoderme ou folheto embrionário intermédio (Aughey & Frye, 2001). As

células mesenquimatosas são multipotentes e migram no embrião até aos órgãos em desenvolvimento onde se desenvolvem de formas distintas, podendo diferenciar-se em condroblastos (Ross & Pawlina, 2011; Aughey & Frye, 2001). Os condroblastos sofrem uma ou duas divisões mitóticas originando pequenos grupos de células maduras denominadas de condrócitos, que ficam dentro de lacunas isoladas por pequenas quantidades de material extracelular (Young & Heath, 2000). A maturação do tecido dá-se do centro para a periferia, acabando as células mesenquimatosas mais superficiais por se diferenciar em fibroblastos e formar o pericôndrio com duas camadas. A camada externa é fibrosa, alberga os fibroblastos e possui uma rede vascular (Gartner & Hiatt, 2011), enquanto a camada interior preserva células com o potencial de se diferenciar em condroblastos e de aumentar a formação cartilaginosa (Bacha, 2000; Young & Heath, 2000).

Os condrócitos têm como principal função manter a integridade da matriz do tecido (Young & Heath, 2000), representando cerca de 1 a 10% do peso hidratado da cartilagem sintetizando constituintes da matriz como os proteoglicanos (PG), as glicoproteínas e o colagénio. A composição, morfologia, estrutura e disposição destas células varia em função da sua localização na cartilagem, (Espanha, 2010). Cada lacuna pode conter entre 2 a 6 condrócitos que derivam da mesma célula mãe, recebendo o nome de grupo isógeno (Bacha, 2000). Dada a ausência de vascularização na cartilagem a oxigenação dos condrócitos encontra-se dificultada, estando as células dependentes de mecanismos de anaerobiose para a obtenção de energia (Junqueira e Carneiro, 2004b). A cartilagem hialina apresenta ainda os condroclastos, células multinucleadas com capacidade de reabsorver a cartilagem (Eurell, 2004).

Todos os elementos celulares estão presentes e envoltos numa matriz extracelular (ME), que na cartilagem hialina representa cerca de 95% do seu volume sendo o elemento funcional do tecido (Ross & Pawlina, 2011b). A ME possui uma componente fluida que corresponde principalmente a água onde se encontram diluídos os nutrientes, os gases, produtos do metabolismo celular e as moléculas sinalizadoras; e uma componente sólida que forma os alicerces da matriz composta por colagénio, por PGs e glucosaminoglicanos (GAGs), e ainda outras proteínas não colagénicas (Espanha, 2010; Gartner & Hiatt, 2011). Os componentes da matriz interagem entre si conferindo à cartilagem a sua forma, estabilidade e rigidez (Junqueira e Carneiro, 2004b; Gartner & Hiatt, 2011).

### **1.1.2- Colagénio**

O colagénio é encontrado em praticamente todo o organismo, representando cerca de 25% do total das proteínas do organismo de canídeos (Gartner & Hiatt, 2011). Tem elevada flexibilidade e resistência à tração e é o constituinte mais abundante na ME da cartilagem hialina. (Ross & Pawlina, 2011b) representando 40% do seu peso seco (Junqueira e

Carneiro, 2004b). As fibras de colagénio são compostas por subunidades filiformes dispostas em feixes denominadas de fibrilhas de colagénio, cujo diâmetro varia entre diferentes localizações e estádios de desenvolvimento. Cada fibrila é formada por moléculas de colagénio ou tropocolagénio que apresentam uma cabeça e uma cauda. Dentro de cada fibrila, as diferentes moléculas de tropocolagénio encontram-se alinhadas lado a lado, e cabeça com cauda entre filas adjacentes. A força das fibrilhas resulta das ligações covalentes que se formam entre as moléculas de filas adjacentes, e não entre moléculas da mesma fila. Cada molécula de colagénio é formada por três cadeias polipeptídicas designadas de cadeias  $\alpha$  que se entrelaçam para a direita formando uma tripla hélice. A sequência das cadeias  $\alpha$  pode variar entre diferentes moléculas de tropocolagénio, com dimensões que vão de 600 a 3000 aminoácidos sendo a glicina, a prolina, a hidroxiprolina e a hidroxilisina as mais frequentes (Gartner & Hiatt, 2011; Ross & Pawlina, 2011).

São quatro os tipos de colagénio que participam na formação da malha tridimensional de fibras da matriz cartilágnea: tipo II (o mais prevalente), VI, IX, e XI. O colagénio tipo X também se encontra presente nas camadas mais profundas da cartilagem (Ross & Pawlina, 2011).

A malha tridimensional de colagénio da ME tem o colagénio do tipo II como principal constituinte. Este é formado por uma tripla hélice com três cadeias  $\alpha$  idênticas, sendo sintetizado na forma de procolagénio tipo IIA existente no interior das células, e tipo IIB que é o predominante em todos os tecidos cartilágneos (Espanha 2010). As moléculas de tropocolagénio tipo II são sempre formadas já no exterior da célula após o corte enzimático dos seus péptidos terminais, e posterior estabilização das suas três cadeias com os resíduos de hidroxiprolina através de pontes de hidrogénio (Olsson & Ekman, 2002). Também se formam ligações cruzadas interfibrilares entre os grupos carbonilo e amina que conferem uma maior estabilidade estrutural, uma maior facilidade na interação do colagénio com os proteoglicanos da matriz e manutenção do estado de hidratação da ME.

O colagénio do tipo IX aparece distribuído pela ME juntamente com o tipo II, encontrando-se ligado a este de forma covalente em intervalos regulares ao longo das suas fibrilhas, facilitando a sua ligação com proteoglicanos da matriz. O tipo XI é formado por três cadeias  $\alpha$  distintas, dispondo-se no interior das fibrilhas do tipo II regulando a sua dimensão (Espanha 2010). O colagénio do tipo VI também é formado por três cadeias  $\alpha$  diferentes, e não se associa ao tipo II na formação da malha de colagénio. Localiza-se em vez de isso principalmente na periferia dos condrócitos, onde facilita a ligação das células com a matriz. O colagénio tipo X apenas se encontra perto do osso subcondral contribuindo para a mineralização da matriz, e organizando a estrutura tridimensional hexagonal do colagénio tipo II (Ross & Pawlina, 2011). Também se encontra presente durante processos patológicos onde ocorre ossificação da cartilagem (Espanha 2010)

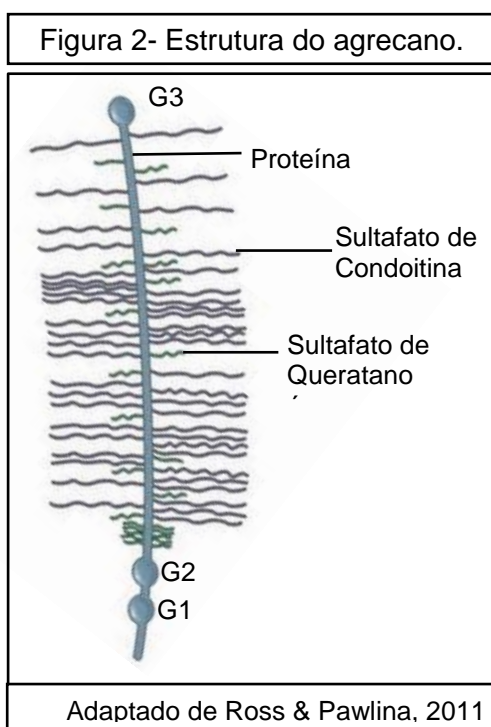
### 1.1.3- Substância Fundamental

A substância fundamental preenche os espaços entre as células e fibras da matriz extracelular, sendo formada principalmente por glucosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos (PGs) e glicoproteínas. A consistência da substância fundamental assemelha-se à de um gel, facilitando a difusão rápida de moléculas hidrossolúveis através da ME (Eurell, 2004; Gartner & Hiatt, 2011; Ross & Pawlina, 2011).

Os GAGs são os heteropolissacarídeos mais abundantes na substância fundamental da matriz, sendo formados por cadeias longas de polissacarídeos não ramificadas onde cada subunidade representa um dissacarídeo. Cada dissacarídeo é composto por dois monossacarídeos, sendo um deles um ácido urónico (ácido idurónico ou glucorónico), e outro um açúcar aminado (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina) (Espanha, 2010). Os GAGs possuem um carácter aniónico devido aos resíduos carboxílicos e aos grupos sulfurados que se ligam a cada subunidade, formando cadeias com carga negativa que se repelem entre elas e que atraem cátions como o  $\text{Na}^+$ , expandindo o seu volume com a fixação de moléculas de água. Os principais GAGs presentes na substância fundamental são o sulfato de condroitina, o sulfato de queratano, o sulfato de dermatano e o ácido hialurónico (Buckwalter et al, 2005; Espanha, 2010). Com exceção do ácido hialurónico (AH), todos os GAGs são sintetizados pelo aparelho de Golgi das células podendo apresentar cerca de trezentos dissacarídeos na sua estrutura e ser sulfurados a diferentes níveis (Gartner & Hiatt, 2011). O sulfato de condroitina é o mais abundante, representando cerca de 60 a 90% do total dos GAGs. A sua N-acetilgalactosamina pode aparecer sulfatada na posição C-4 ou C-6, originando sulfato de condroitina-4 e sulfato de condroitina-6 respectivamente. O sulfato de queratano representa 5 a 20% dos GAGs da cartilagem articular, variando a sua representatividade ao longo da idade. É formado pela repetição de 5 a 6 unidades de n-acetilglucosamina e galactose e não contém ácido urónico. A sua variabilidade é maior do que a do sulfato de condroitina no que respeita ao comprimento e ao nível de sulfatação experimentado. Encontram-se identificados dois tipos de sulfato de dermatano: SD-PGI e SD-PGII, desempenhando ambos um papel na organização do colagénio. Por fim, o AH representa cerca de 1 a 10% dos GAGs da matriz (Espanha, 2010) e distingue-se dos restantes por não ser sulfurado, e pela sua maior estrutura que engloba mais do que dez mil dissacarídeos. É sintetizado por uma enzima localizada na superfície citoplasmática das células, a sintetase do ácido hialurónico, sendo posteriormente translocado para a matriz extracelular (Gartner & Hiatt, 2011). Possui um elevado potencial hidrofílico, sendo que 1g de molécula é o suficiente para reagir com 3 litros de solução salina fisiológica (Uthman *et al.*, 2003). Representa funções estruturais importantes além de realizar a fixação de diversas moléculas em locais específicos da matriz extracelular, e filtrar

as macromoléculas que não conseguem atravessar a sua rede densa (Ross & Pawlina, 2011b).

Todos os GAGs com exceção do AH apresentam tendência para formar ligações covalentes com núcleos proteicos, originando assim os PG da matriz extracelular. Esta ligação ocorre perante um trissacarídeo de ligação presente no GAG, composto por dois resíduos de galactose e um de xilulose, que forma uma ligação O-glicosídica com um núcleo proteico rico em resíduos de serina e treonina (Ross & Pawlina, 2011b). Esta proteína nuclear possui comprimento variável e é normalmente linear, recebendo a ligação de diversas cadeias de GAGs que permanecem orientadas perpendicularmente ao eixo proteico repelindo-se mutuamente devido às suas cargas eletrostáticas (Buckwalter et al, 2005). Os PGs têm como principais funções 1) resistir a forças compressivas, 2) permitir a ligação de moléculas sinalizadoras, 3) facilitar o movimento das células, 4) impedir a propagação de infeções, 5) auxiliar a síntese de colagénio. Também se podem encontrar acoplados a membranas celulares, facilitando a sua ligação à matriz e funcionando como moléculas receptoras (Gartner & Hiatt, 2011). A ligação de factores de crescimento aos PGs pode provocar a sua agregação ou dispersão, amplificando ou inibindo o movimento de macromoléculas, microorganismos e células neoplásicas que possam estar presentes no ambiente extracelular. (Ross & Pawlina, 2011).



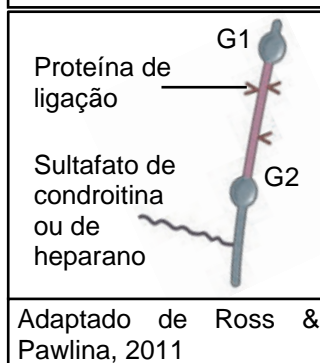
A cartilagem apresenta uma classe de PGs de grandes dimensões, que inclui o Agregcano, o Perlecano, o Versicano e a Proteína da zona superficial (Espanha, 2010). Os agregcanos representam 90% da massa de PGs total e preenchem a maior parte do espaço entre as fibrilhas de colagénio (Buckwalter et al; 2005). Podem conter até cerca de 200 GAGs associados ao seu núcleo proteico, com um comprimento de 3 a 4µm e elevada carga eléctrica negativa capaz de atrair iões  $\text{Na}^+$ . O seu aspecto assemelha-se ao de uma escova onde a proteína central representa a haste e os GAGs as cerdas (Gartner & Hiatt, 2011). A proteína nuclear dos agregcanos possui duas regiões globulares (G1 e G2) que partilham alguma

homologia, e outra região globular (G3) situada na extremidade oposta da cadeia peptídea. A ligação de diversas moléculas de sulfato de condroitina e de queratano ocorre entre G2 e G3 (Rizkalla et al,1992). Apesar de não formar PGs, o AH pode se ligar a estes formando moléculas de agregados de PGs de grandes dimensões (Espanha, 2010; Ross & Pawlina,

2011). A ligação ocorre a nível do domínio G1 da proteína nuclear, sendo esta conexão estabilizada por uma proteína de ligação de sequência peptídica homóloga a G1 (Rizkalla et al,1992). A maioria dos agreganos da cartilagem encontra-se nesta forma agregada com o AH, numa ligação que permite ancorar o PG à matriz extracelular organizando e estabilizando a sua relação com a malha de colagénio (Buckwalter et al 2005). A elevada hidrofília dos agregados de PGs contribui para a viscoelasticidade da cartilagem e provoca uma turgidez na matriz que é benéfica para o amortecimento de forças físicas. O Perlecano é um PG de sulfato de heparano de grandes dimensões que também integra a cartilagem, onde interage com os restantes constituintes da matriz e desempenha papéis na manutenção da rede de colagénio. À semelhança de outros PGs possui a capacidade de interagir com factores de crescimento, traduzindo-se a sua ausência numa redução da dimensão e número das fibrilhas de colagénio. O Versicano é rico em sulfato de condroitina e possui regiões globulares semelhantes às do agregano sendo uma destas a responsável pela sua interação com o AH. A Proteína da zona superficial (SZP), também designada por lubrificina, é sintetizada pelos condrócitos das camadas mais superficiais da cartilagem exercendo uma função lubrificante a nível da superfície articular (Espanha, 2010).

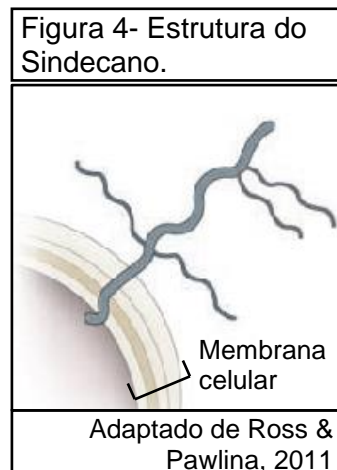
Considera-se ainda na cartilagem articular a presença de proteoglicanos de pequenas dimensões, entre os quais os pertencentes à família de pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRPs) que inclui a Decorina, o Biglicano, Epificano, Fibromodulina e Lumicano. De uma forma geral os SLRPs interagem com as fibrilhas de colagénio da matriz e participam na modulação do metabolismo e manutenção da integridade do tecido. Além destas funções, a Decorina aparenta controlar a proliferação celular por se ligar ao factor de crescimento transformador (TGF- $\beta$ ) modulando a sua atividade. O Biglicano interage com o colagénio do

Figura 3- Estrutura da Decorina.



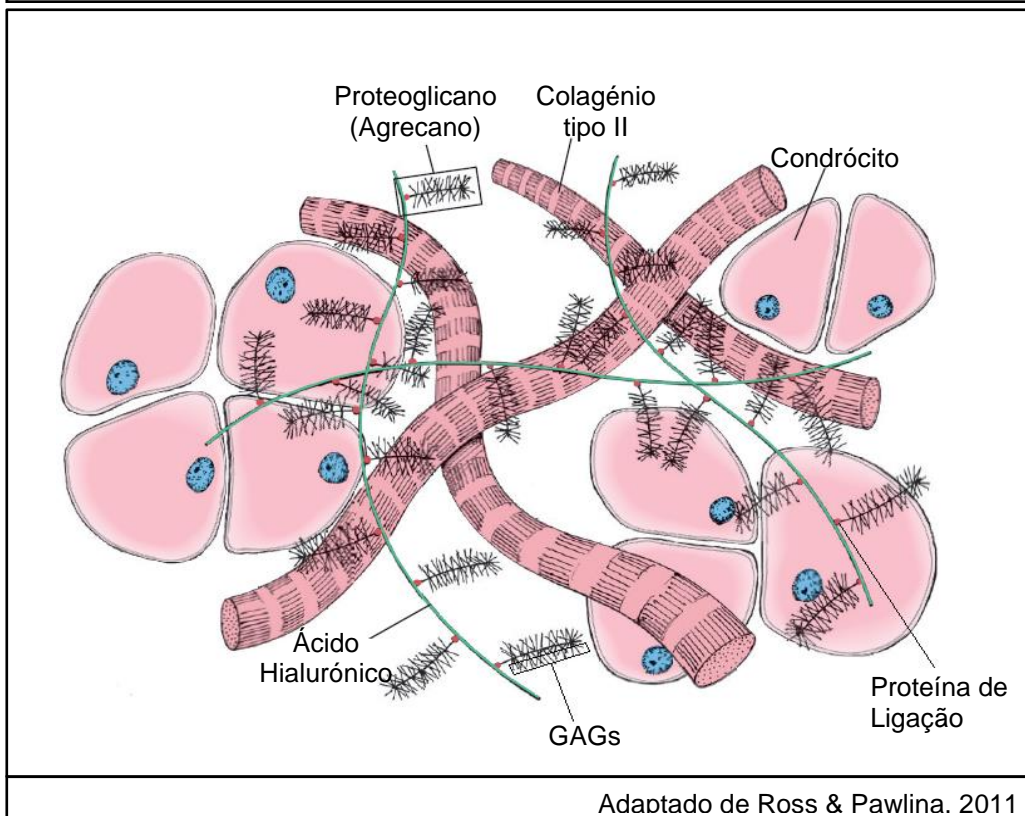
tipo VI participando na formação da sua rede organizada, e o Epificano liga-se a colagénios formadores de fibrilhas. (Espanha, 2010). Alguns PG transmembranares como o sindecano são importantes na integração das células na matriz, facilitando a ligação das suas integrinas ao colagénio, PGs, e proteínas não colagénicas extracelulares (Ross & Pawlina, 2011b).

Por fim, as proteínas colagénicas, também designadas por glicoproteínas multiadesivas, encontram-se ligadas a mono ou oligossacarídeos possuindo diversos locais de ligação para constituintes da matriz como o colagénio, PGs e GAGs, e também para receptores de integrina e laminina das membranas celulares (Ross & Pawlina,



2011b). A Ancorina CII (*cartilage annexin V*), a Proteína oligomérica cartilágnea, a Fibronectina e a Tenascina fazem parte deste grupo. A ancorina CII encontra-se presente principalmente na periferia dos condrócitos, fazendo a sua ligação às fibrilhas de colagénio tipo II (Buckwalter et al, 2005). A proteína oligomérica cartilágnea só existe neste tecido, encontrando-se também na periferia dos condrócitos sendo capaz de se ligar a estes estimulando a síntese de colagénio do tipo II. A fibronectina é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo, e a nível da cartilagem é responsável por controlar a migração celular e por organizar a estrutura da matriz extracelular (Espanha, 2010). A Tenascina é uma glicoproteína de grandes dimensões (Gartner & Hiatt, 2011) que surge durante a embriogénese e desaparece nos tecidos desenvolvidos, reaparecendo durante processos de regeneração cartilágnea. Possui locais de ligação para o fibrinogénio, factores de crescimento semelhantes à insulina (Ross & Pawlina, 2011b), fibronectina e proteoglicanos transmembranares (Gartner & Hiatt, 2011).

Figura 5- Representação da Organização da Cartilagem Hialina.



Adaptado de Ross & Pawlina. 2011

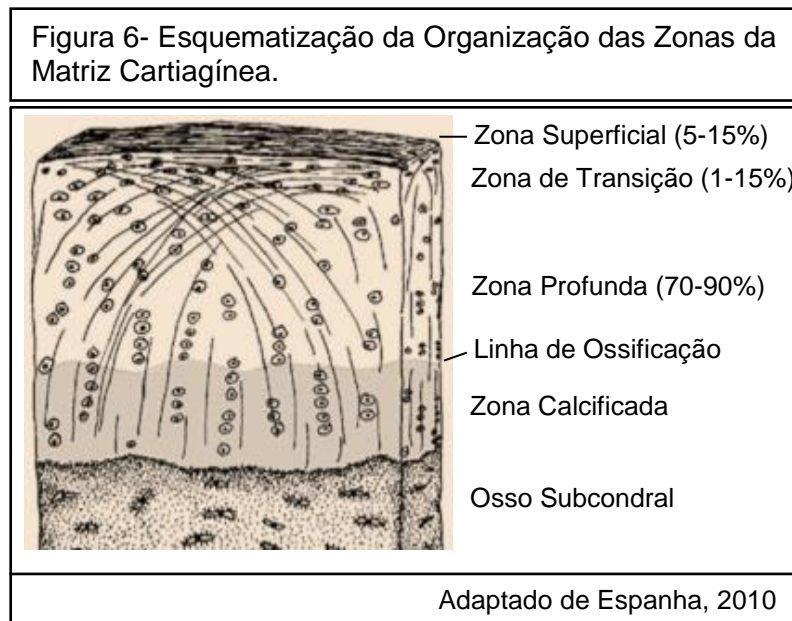
#### 1.1.4- A Organização da Matriz Extracelular

Avançando em profundidade desde a superfície articular com direção à base da massa cartilágnea, verifica-se a existência de diferenças na morfologia, orientação e densidade celular, organização espacial da rede de fibrilhas de colagénio e no conteúdo e distribuição



de PGs (Espanha, 2010; Shulz, 2013). Esta arquitetura estratificada permite à superfície articular resistir a forças de tensão, enquanto as zonas mais profundas conferem resistência às forças de compressão (Todhunter, 2006).

É possível identificar a presença de quatro zonas distintas, sendo elas: a superficial, de transição, profunda e calcificada (Todhunter, 2006; Espanha, 2010; Shulz, 2013).



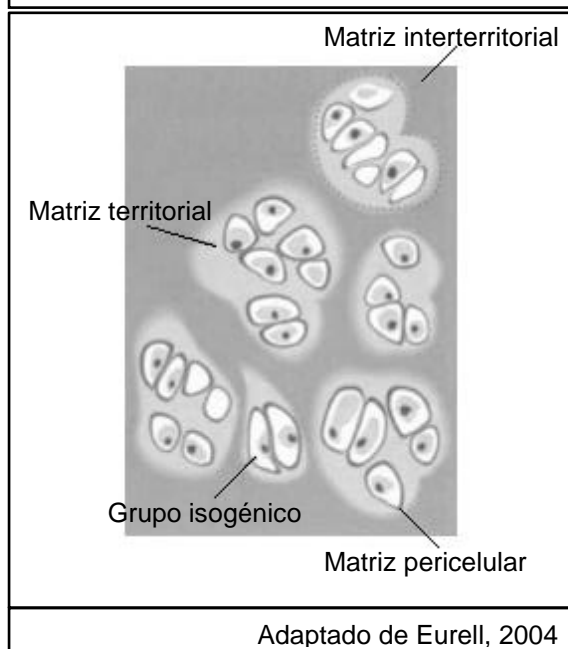
A camada mais tangencial da zona superficial encontra-se coberta por uma membrana de fluido sinovial e recebe o nome de lâmina *splendens* (Bhosale, 2008), que fornece à cartilagem a sua superfície de deslize. Mais profundamente ainda na zona superficial localiza-se uma fina camada de condrocitos alongados orientados paralelamente à superfície articular (Shulz, 2013). As fibras de colágeno tipo II sintetizadas pelos condrocitos deste estrato dispõem-se paralelamente à superfície articular, o que lhe confere mais resistência a forças e tensões. Esta camada também atua como um filtro de macromoléculas, prevenindo lesões da cartilagem por parte do sistema imunitário sinovial (Bhosale, 2008). Geralmente as moléculas de dimensão superior à hemoglobina (69 kD) não se conseguem difundir através deste filtro macromolecular (Todhunter, 2006). Por ser a camada mais exposta, os possíveis efeitos deletérios de um aumento da carga mecânica sobre uma articulação são mais pronunciados a este nível (Pearle et al, 2005). A ruptura desta zona altera as propriedades mecânicas de toda a cartilagem articular, podendo levar ao desenvolvimento de doença degenerativa articular (DDA) (Bhosale, 2008). A zona de transição apresenta condrocitos de forma mais esférica, uma concentração de PGs mais elevada, e grandes fibrilhas de colágeno dispostas aleatoriamente (Shulz, 2013; Bhosale, 2008). A zona profunda é a que apresenta maior dimensão e contém pequenos condrocitos



que se dispõem em colunas perpendiculares à superfície articular (Shulz, 2013). A este nível as fibras de colagénio encontram-se orientadas na vertical em forma de arco, formando ligações subcondrais (Becerra et al, 2010). Esta zona é aquela que possui um conteúdo mais elevado de PGs e ainda assim menor de água (Shulz, 2013), sendo também a que apresenta uma menor celularidade (Bhosale, 2008). Quanto à zona calcificada ela é a mais profunda e faz a ancoragem da cartilagem articular ao osso subcondral. Identifica-se facilmente nas preparações coradas com HE através da presença de linhas de ossificação (Shulz, 2013). Os condrócitos desta zona além de expressarem uma baixa atividade metabólica, surgem em número reduzido, apresentam um fenótipo hipertrófico e são os únicos capazes de sintetizar colagénio do tipo X (Bhosale, 2008).

As diferentes concentrações de PG ao longo da matriz fazem com que após a preparação histológica seja possível identificar regiões com diferentes colorações na matriz cartilágnea (Aughey & Frye, 2001). Tratam-se de regiões especializadas da matriz, as zonas: pericelular, territorial e interterritorial. A matriz da zona pericelular consiste num aro com a espessura de 2µm que se encontra em intimidade com a membrana dos condrócitos (Bhosale, 2008), assemelhando-se a uma lâmina basal que os protege de impactos físicos (Gartner & Hiatt, 2011). Esta região além de conter colagénio do tipo VI é a mais rica em PG, AH, glicoproteínas (fibronectina,

Figura 7- Regiões da Matriz Cartilágnea.



decorina, laminina) e em proteínas não colagénicas, como a Ancorina CII e a decorina associadas à membrana. A zona territorial da matriz envolve grupos de condrócitos ou células individuais e as suas respectivas zonas pericelulares ao longo de toda a cartilagem. Possui fibras de colagénio do tipo II e em menor quantidade do tipo IX, apresentando uma menor quantidade de PG sulfatados pelo que cora menos intensamente do que a matriz pericelular. Ao nível da zona profunda, a matriz territorial envolve cada coluna de condrócitos. As fibras de colagénio deste departamento entrelaçam-se formando um cesto que envolve grupos de células, protegendo as dessa forma dos impactos mecânicos. Por fim a zona inter-territorial abrange um maior volume de matriz em relação às restantes e apresenta as fibras de colagénio de maior diâmetro. A presença de agregados de PGs distingue esta zona das restantes (Bhosale, 2008).

### **1.1.5- Interações e Biomecânica do Binómio Condrócitos - Matriz**

A relação entre os diversos constituintes da ME e os condrócitos não termina após a síntese e excreção destas macromoléculas, assumindo a matriz logo à partida uma função de proteção mecânica das células. Os condrócitos por sua vez são responsáveis por manter a integridade da ME ao longo da vida, detectando alterações moléculares (Ross & Pawlina, 2011b) para depois iniciarem a sua degradação, com síntese e montagem de novos constituintes. Além da função estrutural de proteção, a ME serve como via de passagem e armazenamento de substâncias como nutrientes, novos constituintes da matriz, substratos para a síntese de novas moléculas, produtos do metabolismo celular e outras substâncias como citoquinas e factores de crescimento que regulam as funções celulares (Buckwalter et al, 2005). Funciona ainda como um tradutor de sinais, sendo que a sua deformação produz estímulos mecânicos, eléctricos e químicos que modelam a função dos condrócitos (Bhosale, 2008). O transporte de nutrientes é feito por difusão através de fluxos de água da matriz (Junqueira e Carneiro, 2004b), em fenómenos condicionados pela sua organização e constituição, nomeadamente no que respeita aos seus PGs de maiores dimensões (Ross & Pawlina, 2011b).

Em condições fisiológicas cartilagem articular é sujeita a forças dinâmicas de curta duração e a forças estáticas mais prolongadas (Buckwalter et al, 2005). A elevada hidratação da cartilagem e o movimento de fluido existente permitem à matriz adaptar-se a diferentes cargas físicas contribuindo para o suporte de peso (Ross & Pawlina 2011). As fibrilhas de colagénio são capazes de resistir eficazmente a forças de tensão e cisalhamento, enquanto a pressão osmótica gerada pelos agreganos, é capaz de resistir às forças de compressão e contrariar os fluxos de fluido que se geram dentro da matriz (Buckwalter et al, 2005). Devido à sua elevada hidrofília os PG ocupam em solução um volume cinco vezes superior àquele de que dispõem na matriz, onde a sua expansão é contrariada pelas fibrilhas de colagénio (Olsson & Ekman, 2002). A repulsão eletrostática dos agreganos e a turgidez osmótica que provocam na matriz contribuem para cerca de 50% da rigidez da cartilagem à compressão (Buckwalter et al, 2005).

As compressões provocam alterações físicas e químicas na matriz, nomeadamente no que respeita ao seu conteúdo em água, densidade de carga eléctrica fixa, concentração de iões móveis e pressão osmótica (Buckwalter et al, 2005). A pressurização das compressões faz com que se gere um fluxo que expelle fluido contendo os produtos do metabolismo celular para o espaço articular. Quando esta pressão é removida ou ultrapassada pela força osmótica dos PGs, ocorre expansão da cartilagem com reabsorção de fluido intersticial pela matriz (Shulz, 2013).

A homeostasia da ME e as suas propriedades biomecânicas são preservadas pelo adequado metabolismo dos condrócitos (Pearle et al, 2005), que regulam o seu metabolismo com base nas alterações que detectam na ME (Ross & Pawlina, 2011b). As funções anabólicas e catabólicas destas células são sempre reguladas por mecanismos bioquímicos, nomeadamente a estimulação por parte de hormonas, factores de crescimento e citocinas, mas também por factores físicos como a aplicação de cargas sobre a cartilagem que alteram o microambiente celular. Os movimentos da fase fluida que contém iões móveis e os inúmeros PGs de carga negativa fixos à matriz, fazem com que durante a deformação cartilágnea se gerem alterações eléctricas e químicas no tecido (Guilak & Hung, 2005). Os condrócitos detectam estas alterações através de canais iónicos, ligação das suas integrinas aos constituintes da ME e através da deformação da sua membrana (Pelletier et al, 2001). Estes estímulos levam os condrócitos a iniciar a síntese de citocinas e de factores de crescimento para o interior das lacunas. Por se tratar de um tecido avascular, estes mediadores podem ficar sequestrados na matriz contribuindo para o balanço metabólico celular de forma autócrina e parácrina (Pelletier et al, 2001).

Os condrócitos podem ser estimulados a iniciar a síntese de citocinas anabólicas e factores tróficos como o factor de transformação de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e factores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I) (Buckwalter et al, 2005), que promovem o anabolismo cartilágneo e induzem respostas de reparação do tecido. O TGF- $\beta$  também estimula a síntese de SZP/lubricina pelos condrócitos e células sinoviais (Becerra et al, 2010), deprime a atividade proteolítica, e regula a migração, proliferação, diferenciação e apoptose celular (Todhunter, 2006). O factor básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) é o mais potente estimulador da replicação dos condrócitos. Outros membros da família de factores de crescimento de fibroblastos (FGF) podem interagir com o IGF-1 e TGF- $\beta$  promovendo funções celulares específicas de acordo com o seu grau de diferenciação (Becerra et al, 2010). A somatomedina C induz o crescimento da cartilagem através do aumento da capacidade sintética e replicativa das células, enquanto outros agentes como a tiroxina e a testosterona aumentam a síntese de PG (Junqueira & Carneiro, 2004b). A presença de fragmentos de algumas moléculas degradadas também pode estimular a síntese de novos constituintes da matriz (Sandell & Aigner, 2001). A capacidade de síntese dos condrócitos encontra-se comprometida de forma reversível durante períodos de compressão estática fisiológicos, havendo diminuição da expressão génica de colagénio do tipo II, proteína nuclear de agrecanos e também de proteínas de ligação (Buckwalter et al, 2005).

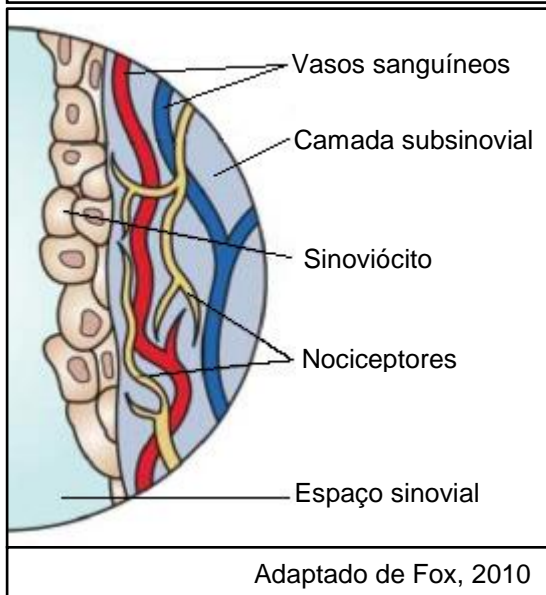
No entanto, os condrócitos também podem ser estimulados a produzir citocinas inflamatórias com potencial catabólico, como o factor necrosante tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas (ILs), que provocam a diminuição da síntese de ME e potenciam a produção de

um conjunto de enzimas proteolíticas da matriz designadas de metaloproteinases (MMPs), e de proteases de serina e cisteína que actuam como ativadores destas MMPs. A presença de fragmentos de fibronectina também pode desencadear eventos catabólicos e a degradação da matriz pelos condrócitos (Sandell & Aigner, 2001). A ação das citocinas inflamatórias é influenciada por factores como as prostaglandinas, o TGF- $\beta$ , inibidores de metaloproteinases tecidulares (TIMPs), activador e inibidor do plasminogenio tecidular entre outras moléculas (Buckwalter et al, 2005). Na cartilagem articular normal, os TIMPs encontram-se numa quantidade ligeiramente superior às MMPs (Todhunter, 2006).

A relação entre as diferentes citocinas inflamatórias é descrita mais detalhadamente no capítulo sobre a bioquímica da DDA.

## 1.2- Cápsula Articular

Figura 8- Organização da Membrana Sinovial



A cápsula articular delimita o espaço articular, que além de um conjunto de estruturas acessórias ao funcionamento da articulação também contém o líquido sinovial. A pressão intra-articular é sub-atmosférica (-2 a -6 mmHg) contribuindo para a estabilização da articulação (Todhunter, 2006). É formada por duas camadas: uma externa fibrosa; e uma camada interna dotada de vascularização e terminações nervosas designada de membrana sinovial. A camada fibrosa contribui para a estabilidade da diartrose inserindo-se no osso a diferentes distâncias da superfície articular, apresentando-se em continuidade com o pericôndrio ou o periósteo (Getty, 1986; König, 2004). Possui

diversas terminações nervosas responsáveis por detetar e emitir sinais dolorosos durante processos patológicos (König, 2004; Reece, 2005), e por desenvolver os arcos reflexos e os estímulos proprioceptivos (Reece, 2005). Em algumas situações a camada fibrosa encontra-se praticamente ausente, sendo a cápsula formada apenas pela membrana sinovial, a qual reveste todo o interior do espaço articular com exceção das superfícies articulares. Esta membrana possui vascularização, enervação, e é responsável pela síntese de líquido sinovial (Getty, 1986). A sua espessura é reduzida e apresenta vilosidades e pregas que se estendem para o interior da cavidade e que podem conter almofadas adiposas intra-articulares (Getty, 1986). Divide-se numa camada de células sinoviais, a íntima sinovial, e outra camada subsinovial ou estrato sinovial (König, 2004). A íntima sinovial tem a espessura de uma a quatro células que formam uma camada descontínua na superfície

interna da cápsula, desprovida de lâmina basal (Todhunter, 2006). Estas células são os sinoviócitos do tipo A e tipo B, e ainda células dendríticas. Os sinoviócitos do tipo A derivam da medula óssea, fazem parte do sistema mononuclear fagocitário (SMNF) e são capazes de sintetizar Interleucina-1 (IL-1), prostaglandina E (PGE) (Shulz, 2013) e o AH (Weisbrode, 2007). Os sinovicitos do tipo B assemelham-se a fibroblastos, são ricos em RER e também sintetizam GAGs como o AH que é adicionado ao líquido sinovial (Todhunter, 2006; Shulz, 2013). Em situações inflamatórias estas células também sintetizam citocinas pro-inflamatórias que afectam o metabolismo dos condrócitos (Todhunter, 2006). A camada subsinovial além de possuir vascularização e nociceptores permite ainda que a membrana sinovial se movimente de forma mais independente em relação à camada fibrosa (Fox & Millis, 2010b).

As artérias que irrigam as articulações são em norma as mesmas responsáveis pelo aporte sanguíneo do osso adjacente, enquanto os vasos linfáticos presentes na membrana sinovial fazem a drenagem até aos linfonodos regionais (Reece, 2005). No que respeita à enervação as terminações nervosas das diartroses são independentes e provêm de ramos de nervos periféricos e de músculos adjacentes, sendo importantes na propriocepção e nocicepção, ajudando a limitar os movimentos articulares às suas amplitudes fisiológicas (Todhunter, 2006). A propriocepção é da responsabilidade de corpúsculos mecanorreceptores localizados na cápsula fibrosa, enquanto os nociceptores, se encontram dispostos pela articulação, tecidos periarticulares, cápsula e ligamentos articulares, periósteo e osso subcondral (Lee et al, 2013). Os nervos sensitivos articulares contêm fibras A $\beta$ , A $\delta$  e fibras C. As fibras A $\beta$  contêm terminações corpusculares que se distribuem pelos ligamentos periarticulares e cápsula fibrosa, e terminações nervosas livres em todas as estruturas articulares com a exceção da cartilagem hialina. A sensação de dor pode surgir devido a estímulos mecânicos deletérios, térmicos, ou químicos que atuem sobre os ligamentos e cápsula articular. As fibras-C são designadas por nociceptores silenciosos, por normalmente não responderem a estímulos nocivos em articulações normais, tornando-se ativas após desenvolvimento de inflamação articular (Innes, 2012).

### **1.3- O Líquido Sinovial**

O líquido sinovial, ou sinóvia, assemelha-se a um dialisado do plasma filtrado através do endotélio da membrana sinovial contendo albumina, mucina e sais (Getty, 1982), sendo suplementado com AH e PG pelos sinoviócitos B (Shulz, 2013). A troca de solutos entre o plasma e o líquido sinovial é controlada pelos gradientes de pressão hidrostática e oncótica entre ambos os meios (Todhunter, 2006), e o seu aspecto normal é o de um fluido viscoso, de cor clara, (Todhunter, 2006; Weisbrode, 2007) e de pH alcalino (Todhunter, 2006).

É a partir da sinóvia que a matriz cartilágnea filtra o seu fluido intersticial que irá nutrir os condrócitos, e também aumentar a elasticidade e o volume do tecido (Shulz, 2013). As moléculas lipofílicas, o oxigénio e o dióxido de carbono difundem-se livremente entre o fluido intersticial e o líquido sinovial (Todhunter, 2006), enquanto o transporte de nutrientes e metabolitos ocorre associado ao fluxo gerado pela deformação cartilágnea durante o suporte de carga (Shulz, 2013; Piermattei, Flo & DeCamp, 2006). Durante estas deformações ocorre a extrusão de fluido intersticial rico em resíduos metabólicos para o espaço sinovial, onde se mistura com a sinóvia formando uma camada de fluido lubrificante pressurizado entre as superfícies articulares. A remoção da carga permite a expansão da cartilagem e a nova filtração de líquido intersticial pela matriz graças à hidrofília dos PG (Shulz, 2013).

Em condições fisiológicas, durante mobilizações lentas o líquido sinovial comporta-se como um estrato lubrificante viscoso entre ambas as superfícies articulares, ou como uma camada amortecedora elástica perante movimentos mais rápidos (Uthman, Raynauld & Haraoui, 2003). Esta pseudoplasticidade designa-se tixotropia, e é uma característica conferida pelo AH. Durante a sustentação de cargas fisiológicas a lubricina sintetizada pelos condrócitos da zona superficial associa-se a fosfolípidos e liga-se à superfície articular, diminuindo a superfície de contacto e criando uma camada resistente que lubrifica e protege do atrito associado ao movimento. Quando a carga aplicada é superior, o fluido intersticial expelido durante a compressão é o principal mecanismo de lubrificação (Todhunter, 2006).

#### **1.4- Ligamentos, Meniscos e Almofadas Adiposas Articulares**

Os ligamentos são bandas ou faixas de tecido fibroso que contêm principalmente colagénio do tipo I (Todhunter, 2006), apresentam alta maleabilidade e uma baixa elasticidade, sendo responsáveis por unir as extremidades ósseas da diartrose promovendo a assim sua estabilidade. De acordo com a sua localização em relação à articulação, são classificados como extracapsulares (periarticulares) ou intracapsulares (intra-articulares). Apesar dos ligamentos intra-articulares estarem no interior da cápsula fibrosa, eles não se encontram no interior da cavidade articular uma vez que se são revestidos por membrana sinovial (Getty, 1982). Os ligamentos periarticulares relacionam-se frequentemente com a cápsula fibrosa podendo mesmo chegar formar parte desta, ou apresentar-se totalmente individualizados. (Todhunter, 2006).

Os meniscos são placas de fibrocartilagem que se situam entre algumas superfícies articulares, diminuindo o desgaste cartilágneo, aumentando a congruência entre as superfícies e permitindo uma maior variedade e amplitude de movimentos (Getty, 1982). As almofadas adiposas encontram-se em locais semelhantes aos meniscos, protegendo e

estabilizando a articulação ao preencherem os espaços vazios no seu interior (Tartaglia & Waugh, 2005).

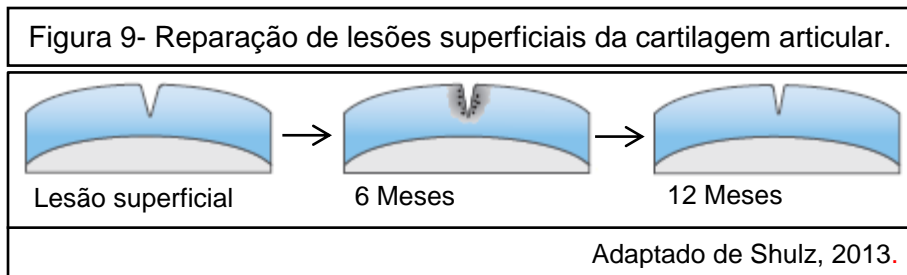
## **2- Patologia das Articulações Sinoviais**

Com base na população de células presente, uma artrite pode ser classificada como inflamatória ou não inflamatória, ainda que todas as formas de artrite envolvam algum grau de inflamação (Todhunter, 2006).

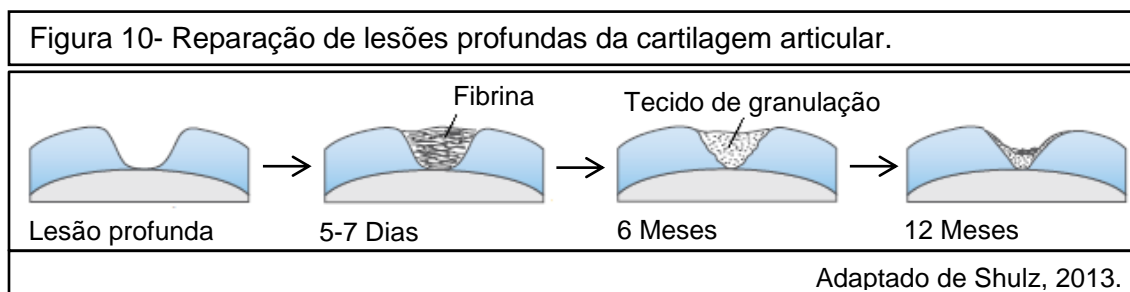
Qualquer tipo de processo patológico, lesão física ou agente tóxico que afete a cartilagem articular e a membrana sinovial pode resultar no desenvolvimento de artrite, que é uma resposta inflamatória da articulação com intensidade variável. O termo sinovite aplica-se quando o processo inflamatório se restringe à membrana sinovial (Weisbrode, 2007).

A manutenção da homeostasia articular assemelha-se à de um órgão, havendo interações entre os vários tecidos que constituem a articulação (Todhunter, 2006). A cartilagem hialina por exemplo, não apresenta vascularização mas é fortemente influenciada por sinovites, reações do osso subcondral e ainda pelo metabolismo das cartilagens epifisárias (Weisbrode, 2007). No entanto, e embora a cartilagem possua células metabolicamente ativas, a sua resposta às agressões e capacidade de regenerar o tecido são limitadas (Weisbrode, 2007). Apesar de normalmente não se visualizarem células mitóticas no tecido, os condrócitos situados na periferia das lesões tendem a aumentar a sua síntese de ADN e a formar grupos de células (Pelletier et al, 2001). Este mecanismo é por si só ineficaz no preenchimento do defeito, ocorrendo também uma mobilização de matriz para dentro da lesão, facilitada pelos movimentos articulares e pela sustentação de peso (Weisbrode, 2007).

Considerando que a cartilagem articular não possui terminações nervosas ou vasos, as lesões mecânicas ou químicas da articulação sinovial só se tornam clínicas quando ocorre uma reação sinovial ou lesão subcondral (Weisbrode, 2007; Todhunter, 2006). Os processos inflamatórios de reparação também só ocorrem com o desenvolvimento de lesões profundas que alcancem o osso subcondral (Piermattei et al, 2006), podendo os defeitos superficiais subsequentes da erosão cartilágnea persistir durante longos períodos de tempo (Weisbrode, 2007).



Quando uma lesão se estende até ao osso subcondral o defeito é rapidamente preenchido por um tecido fibroso vascularizado, que frequentemente sofre metaplasia originando fibrocartilagem e mais raramente cartilagem hialina (Weisbrode, 2007). A alteração das propriedades da matriz extracelular faz com que mais impactos físicos sejam transferidos para o osso subcondral, que responde aumentando a sua densidade. A utilização contínua da articulação neste contexto leva a que o osso destas regiões além de denso se torne liso como o marfim, num processo designado por eburnação (Weisbrode, 2007). Por vezes podem ocorrer processos de remodelação óssea aberrantes, esclerose subcondral e até quistos ósseos (Buckwalter et al, 2005). Fragmentos pequenos de cartilagem sobrejacente a estas regiões podem-se destacar e aderir à membrana sinovial onde são rodeados por macrófagos e células gigantes, enquanto os fragmentos de maiores dimensões podem sofrer ossificação e permanecer como osteófitos no espaço articular, onde continuam a ser nutridos pelo líquido sinovial (Weisbrode, 2007).



A membrana sinovial responde normalmente às agressões hipertrofiando, desenvolvendo uma hiperplasia vilosa, ou pela formação de *pannus* que consiste no desenvolvimento de uma camada anormal de tecido de granulação vascularizado. A hipertrofia vilosa pode ocorrer com ou sem a presença concomitante de sinovite. Estas alterações estão associadas a uma diminuição da produção de sinóvia prejudicando a homeostasia articular. Durante a sinovite, a proporção entre os sinovicitos do tipo A e tipo B pode estar alterada durante a sinovite, e a drenagem do fluido sinovial ficar dificultada pela presença de infiltrados de células inflamatórias (Weisbrode, 2007).



## **2.1- Doenças Articulares Inflamatórias**

Este grupo de doenças articulares tem causas infecciosas ou imunológicas, caracterizando-se pela presença de sinovite e consequente alteração do fluido sinovial. A claudicação de um ou mais membros e as alterações da marcha são os sinais clínicos mais frequentes, podendo no entanto em alguns casos verificar-se manifestações sistêmicas como febre, letargia, anorexia e leucocitose (Piermattei et al, 2006). Nas artrites infecciosas os agentes envolvidos podem ser bactérias, fungos, micoplasmas e ainda protozoários. Alguns destes agentes também podem despoletar artrites imunomediada devido à formação de complexos imunes que se depositam na membrana sinovial, ativando as cascatas de inflamação responsáveis pelo desenvolvimento de sintomatologia. As artrites imunomediadas também podem ser despoletadas por fármacos e vacinas (Goldstein, 2010), ou ser autoimunes e surgir associadas à alteração de Imunoglobulinas M (IgM) e G (IgG) do paciente (Artrite Reumatóide) ou devido à formação de anticorpos antinucleares (Lupus Eritematoso Sistémico) (Goldstein, 2010). Algumas raças apresentam predisposição para o desenvolvimento de poliartrites imunomediadas, como o Shar-pei e o Akita Japonês (Taylor, 2009).

As artrites inflamatórias estão associadas à destruição progressiva dos tecidos articulares, pelo que o seu diagnóstico e tratamento precoce podem permitir limitar a lesão da articulação e a evolução para uma condição de doença degenerativa (Marchevsky & Read, 1999).

## **2.2- Doenças Articulares Não Inflamatórias**

Exemplos destas condições são as decorrentes de traumatismos como luxações, fraturas, neoplasias e instabilidade articular resultante da ruptura de ligamentos, que originam incongruências entre as superfícies articulares fazendo com que durante o suporte de peso surjam novas lesões na cartilagem. A evolução destes processos pode gerar além da erosão das superfícies articulares, a deformação dos contornos ósseos da articulação e evolução para doença degenerativa, resultante do comprometimento da função normal de nutrição e lubrificação da cartilagem (Shulzl, 2013; Piermattei et al, 2006).

### **2.2.1- A Doença Degenerativa Articular**

Também designada por osteoartrite ou osteoartrose, a doença degenerativa articular (DDA) é a doença articular mais comum em animais de companhia afectando aproximadamente 20% dos cães adultos (Fox, 2010; Innes, 2012), representando também a principal causa de dor crónica desta espécie (Fox & Millis, 2010b). Mais do que um agente etiológico, a DDA deve ser encarada como um processo patológico uma vez que pode ser o desfecho comum de diversas entidades clínicas (Weisbrode, 2007).

Apesar de historicamente ser descrita como uma doença articular não inflamatória, na DDA verifica-se o desenvolvimento de uma inflamação não purulenta de intensidade variável (Fox & Millis, 2010b). Em condições fisiológicas os componentes da ME encontram-se num estado de renovação baixo, numa homeostasia mantida pelo equilíbrio entre o catabolismo e anabolismo dos condrócitos (Guilak, 2011). Quando este equilíbrio é perturbado, pode ocorrer evolução no sentido da degradação da cartilagem iniciando-se a cadeia de eventos associada à DDA. Este processo é normalmente desencadeado por uma perturbação mecânica da função articular que sofre modulação por factores químicos (Fox & Millis, 2010b). Os mecanismos de regeneração endógenos entram em funcionamento, mas são normalmente ineficazes no controlo da situação não havendo coordenação entre os fenómenos de destruição e reparação articulares (Piermattei et al, 2006), acabando assim por se desenvolver alterações em todos tecidos articulares e periarticulares como músculos, ligamentos e tendões pela inibição da sua utilização (Innes, 2012). Estas alterações patológicas estão associadas a manifestações de dor, incapacidade motora e perda de qualidade de vida do doente, principalmente devido à perda de cartilagem articular, remodelação subcondral e formação de osteófitos (Weisbrode, 2007).

A doença é classificada de acordo com as articulações envolvidas, podendo ser mono ou poliarticular, e quanto à sua etiologia em primária ou idiopática, ou secundária (Fox & Millis, 2010b). A forma primária é a mais prevalente em indivíduos de maior idade e naqueles cuja cartilagem articular já apresenta algum grau de desgaste e alteração (Piermattei et al, 2006). A forma secundária é a mais comum em cães, surgindo normalmente na sequência de outro processo patológico como: lesões traumáticas; instabilidade articular; alterações de desenvolvimento (Innes, 2012); sinovites; aumento da rigidez do osso subcondral (Weisbrode, 2007); factores metabólicos; e factores neurológicos que afectem a articulação e estruturas adjacentes (Piermattei et al, 2006). Cada indivíduo apresenta uma predisposição própria para desenvolver a condição assente em parâmetros genéticos, na idade, e em factores sistémicos como por exemplo a obesidade. A estes parâmetros intrínsecos associam-se todos os outros que atuam localmente a nível da articulação contribuindo para o despoletar da DDA, nomeadamente traumatismos, instabilidade, mau alinhamento articular ou defeitos hereditários como a displasia de anca (Innes, 2012). Devido à complexidade dos factores envolvidos no seu aparecimento, a etiologia da DDA ao nível de uma articulação em particular pode ser difícil de identificar (Innes, 2012).

#### **2.2.1.1- Factores predisponentes**

No que respeita aos factores genéticos, apesar dos genes que controlam a susceptibilidade para o desenvolvimento de DDA em cães não serem ainda conhecidos, já se registaram progressos na compreensão da base genética de algumas entidades com potencial para

desencadear DDA, como é o caso da displasia de anca ou da ruptura do ligamento cruzado cranial (RLCC) (Innes, 2012).

O envelhecimento também influencia as estruturas articulares que vêm diminuindo as suas propriedades regenerativas e a sua resistência (Piermattei et al, 2006). Os condrócitos envelhecidos sintetizam moléculas de agreganos em menor quantidade e dimensão, assim como proteínas de ligação menos funcionais. O índice mitótico das células também reduz assim como a sua resposta a estímulos anabólicos. A exposição sucessiva ao longo da vida à atividade de enzimas como as MMPs também afecta a dimensão e a uniformidade dos agreganos, contribuindo para a perda das suas propriedades hidrofílicas (Innes, 2012). A estrutura do colagénio do tipo II também é alterada pelo envelhecimento ocorrendo ligações cruzadas entre diferentes fibrilhas de colagénio, fator já associado a um aumento da gravidade da DDA em cães (Innes, 2012).

Os animais mais pesados apresentam um maior risco de desenvolvimento de condições que podem desencadear DDA, como por exemplo a displasia de anca e a RLCC (Innes, 2012). Na obesidade a biomecânica associada à locomoção está alterada ocorrendo uma sobrecarga das regiões cartilagíneas que suportam o peso (Guilak, 2011). Vários estudos demonstram que cães obesos apresentam uma maior predisposição para desenvolver DDA a nível da anca, cotovelo e ombro (Innes, 2012; Johnston et al, 2008; Kealy et al., 2000). No homem com excesso de peso, o osso subcondral adapta-se aumentando a sua densidade, tornando-se menos eficaz na dissipação de forças de choque fisiológicas, fazendo com que os impactos sejam redireccionados para a cartilagem lesionando dessa forma os condrócitos (Weisbrode, 2007). Inicialmente pensava-se que em cães obesos os factores mecânicos derivados da sobrecarga articular fossem o principal factor despoletante e perpetuante da DDA, no entanto, estudos mais recentes revelaram no entanto que a atividade metabólica dos adipócitos é um factor tão ou mais determinante na patogenia da doença (Guilak, 2011; Fox & Millis, 2010b).

Diversos tecidos articulares como o osso, os ligamentos e a membrana sinovial possuem receptores estrogénicos. Através da utilização de modelos animais testou-se o efeito da ovariectomia no desenvolvimento de osteoartrite, tendo-se verificado na maioria dos casos a ocorrência precoce de alterações biomecânicas e histológicas articulares compatíveis com DDA. Dados epidemiológicos também mostram que o risco para algumas doenças articulares em cães aumenta após a esterilização, o que se traduz simultaneamente num aumento do risco de desenvolvimento da DDA (Innes, 2012; Guilak, 2011).

O nível de exercício e as condições de alojamento são alguns dos factores que podem contribuir para o desenvolvimento de DDA. O alojamento de cachorros até aos 49 dias de idade em pisos escorregadios está identificado como sendo um fator de risco para o

desenvolvimento de sinais clínicos de displasia de anca e DDA (Innes, 2012). Um estudo realizado na Suécia com base no inquérito a 325 proprietários de cães com DDA, revelou que perseguir bolas ou outros objetos arremessados é um tipo de exercício que aumenta o risco de displasia de cotovelo e anca (Innes, 2012). Alguns tipos de exercício são no entanto benéficos por promoverem a estabilidade articular através do aumento da massa muscular e melhorarem a nutrição da cartilagem (Piermattei et al, 2006).

#### **2.2.1.2- A Fisiopatologia da DDA**

O seu processo patológico pode ser dividido em três etapas: 1) lesão e alteração da matriz cartilágnea; 2) resposta às lesões por parte dos condrócitos com o inevitável declínio da sua função de síntese; 3) degenerescência com perda progressiva do tecido;

Os eventos da primeira etapa podem ser despoletados por impactos de alta intensidade, torsão ou inflamação articular, alterações metabólicas entre as quais as associadas ao envelhecimento (Weisbrode, 2007), que provocam a perda de integridade das camadas mais superficiais do tecido (Buckwalter et al, 2005). As consequentes lesões celulares resultam na libertação de proteases lisossomiais que induzem a perda de PGs e a ativação de outras enzimas presentes na matriz como as MMPs (Piermattei et al, 2006). As MMPs são uma família de enzimas proteolíticas dependentes de zinco capazes de fazer a digestão dos constituintes da ME (Pearle et al, 2005), integrando a cartilagem em condições fisiológicas na sua forma inativa. As MMPs iniciam o corte enzimático das proteínas nucleares dos agreganos, diminuindo a sua capacidade de se agregarem com o AH (Espanha, 2010), verificando-se também uma diminuição da sua concentração e do comprimento das suas cadeia de GAGs. Numa fase inicial o colagénio do tipo II ainda não se encontra destruído, mas vê a sua relação com os restantes colagénios e macromoléculas da matriz alterada o que permite uma expansão hidrófila adicional dos agreganos existentes. Isto explica o porquê de apesar de haver uma diminuição da funcionalidade e do número de agreganos ocorre o aumento da quantidade de água do tecido (Buckwalter et al, 2005). Estas alterações na estrutura da matriz resultam no desenvolvimento de um fenómeno denominado de condromalácia, que se caracteriza pela diminuição da rigidez compressiva do tecido, fruto da sua maior permeabilidade que torna impossível a manutenção da pressão hidrostática fisiológica (Pearle et al, 2005). Os pequenos defeitos iniciais acabam por aprofundar originando fendas que vão tornando a superfície progressivamente mais irregular, podendo mesmo haver perda de fragmentos de cartilagem para o espaço articular (Buckwalter et al, 2005). Os processos de erosão física e a degradação enzimática da matriz contribuem ambos para a redução da espessura cartilágnea, podendo acabar por expor o osso subcondral que se torna mais denso, e por vezes com sinais de necrose (Piermattei et

al, 2006). Também ocorre a duplicação das linhas de ossificação (Pearle et al, 2005) que são invadidas por vasos subcondrais (Piermattei et al, 2006).

Os subprodutos do catabolismo cartilágneo vão sendo libertados para a sinóvia onde sofrem fagocitose pelas células sinoviais que se multiplicam e hipertrofiam (Fernandes et al, 2002). Dá-se assim o desenvolvimento de uma sinovite e inflamação secundária que potencia o desenvolvimento de efusões articulares (Piermattei et al, 2006), resultantes da vasodilatação e aumento da permeabilidade subsinovial que passa a permitir o extravasamento de proteínas e células inflamatórias para o espaço articular (Center, 2012). A sinovite caracteriza-se pelo aumento das células mononucleares fagocitárias na membrana subsinovial, incluindo linfócitos do tipo B ativos e linfócitos T (Pelletier et al, 2001). Estas alterações são mais pronunciadas nas zonas onde a membrana sinovial se sobrepõe à cartilagem (Creamer, 1997). Com a perpetuação da sinovite pode desenvolver-se um grau variável de fibrose capsular (Innes, 2012) que contribui para a diminuição da amplitude articular, limitando a superfície de cartilagem envolvida no suporte de peso que desta forma acaba sobrecarregada (Allan, 2002).

O aprofundamento das úlceras cartilágneas deixa as fibrilhas de colagénio e as células das camadas mais profundas gradualmente menos protegidas (Piermattei et al, 2006). Estes condrócitos passam também a contribuir para as reações líticas em curso com a produção de mais proteases, MMPs (Piermattei et al, 2006) e ON. O ON difunde-se rapidamente pelo tecido induzindo a produção de IL-1 $\beta$ , que irá potenciar a expressão das MMPs. Fragmentos de fibronectina e de outras moléculas danificadas também se tornam indutoras da produção de IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  (Buckwalter et al, 2005).

Durante a destruição da ME também ocorre a libertação de citocinas anabólicas que se encontravam sequestradas no seu interior. São activadas as funções de reparação do tecido, com replicação dos condrócitos e aumento da síntese de PGs, podendo também ocorrer a formação de tecido de granulação (Piermattei et al, 2006). Estes mecanismos podem persistir durante anos numa tentativa de estabilizar a condição, chegando a restaurar o tecido em casos raros (Buckwalter et al, 2005). A falha em estabilizar os eventos catabólicos permite a progressão para a terceira e última etapa da DDA, caracterizada por uma perda progressiva de cartilagem articular com a redução das capacidades proliferativas e sintéticas dos condrócitos. Este declínio pode resultar da lesão e morte dos condrócitos, assim como das alterações nos mecanismos de sinalização do tecido (Buckwalter et al, 2005).

Algumas das macromoléculas da ME revelam propriedades antigénicas que normalmente não se expressam por se encontrarem escondidas do sistema vascular no interior da cartilagem. As alterações hemodinâmicas que se verificam durante a DDA e a exposição dos constituintes da cartilagem podem no entanto alterar esta premissa (Buckwalter et al,

2005). Este facto explica o desenvolvimento de imunidade celular contra a proteína de ligação dos PG com o AH, e também a formação de complexos imunes com anticorpos de colagénio tipo II ao nível da camada superficial da cartilagem (Pelletier et al, 2001).

### **2.2.1.3- A Bioquímica da DDA**

A degradação preteolítica dos diferentes tipos de colagénios e dos PGs cartilagíneos durante a DDA é resultado do desequilíbrio entre a presença de proteinases e os seus inibidores. Das famílias de enzimas intervenientes destacam-se as MMPs, capazes de degradar moléculas intactas de colagénio e PGs (Goldring, 2000), e as adamalinas (ADAMTS) que influenciam a síntese e degradação da ME (Kevorkian et al, 2004).

De uma forma geral, as MMPs intervenientes na DDA pertencem aos grupos das collagenases, estromelinas, matrilinas e gelatinases (Weisbrode, 2007). Apesar de integrarem a cartilagem em condições fisiológicas, durante a DDA a síntese destas enzimas (por parte dos condrócitos) encontra-se aumentada por estimulação de mediadores inflamatórios como a IL-1 e o TNF $\alpha$ , promovendo um desequilíbrio entre a sua quantidade e os TIMPs existentes (Pearlee et al, 2005). Estas enzimas tornam-se ativas na sequência de sobrecargas físicas, presença de produtos da degeneração do tecido, estimulação por outras MMPs, condrócitos reativos, plasmina ou células inflamatórias (Buckwalter et al, 2005).

As collagenases estão envolvidas na degradação dos colagénios da cartilagem, sendo as únicas proteases mamíferas capazes de degradar a sua tripla hélice de cadeias  $\alpha$  em pH neutro (Kevorkian et al, 2004). O processamento do colagénio do tipo II por estas enzimas origina dois fragmentos com 75% e 25% da dimensão da molécula original (Mitchell et al, 1996). Na DDA expressam-se as collagenases-1 (MMP-1), 2 (MMP-8), 3 (MMP-13), e também a MMT membranária do tipo I (MMP-14) (Goldring, 2000). A MMP-13 sobressai entre as restantes pela sua especificidade para o colagénio tipo II, e por degradar a molécula cerca de 10 vezes mais rápido comparativamente com a MMP-8 (Mitchell et al, 1996). As collagenases também são capazes de degradar os agrecanos juntamente com as famílias das matrilinas, estromelinas e gelatinases. Esta degradação é desencadeada pela clivagem proteolítica do domínio interglobular (G1 – G2) do agrecano por parte das MMPs. Apesar desta capacidade, as adamalinas são as enzimas mais especializadas na clivagem dos agrecanos, motivo pelo qual foram baptizadas de agrecanases (Fosang et al, 1995). Na fisiopatologia da DDA as agrecanases-1 (ADAM-TS4) e 2 (ADAM-TS5) são as mais importantes (Goldring, 2000), promovendo o corte da proteína nuclear no seu domínio interglobular, mas a um nível diferente das outras enzimas (Fosang et al, 1995).

A estromelina-1 (MMP-3), além de também promover a degradação de agrecanos de forma eficaz, é dotada da capacidade para ativar collagenases que se encontrem em

latência (Goldring, 2000 -2). Por outro lado o grupo das gelatinases, nomeadamente as gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9), digerem o colagénio tipo VI da matriz pericelular mas são menos eficazes sobre o tipo II (Weisbrode, 2007). A função deste grupo também inclui prosseguir com a degradação de moléculas iniciada por outras enzimas (Goldring, 2000). A matrilisina (MMP-7) é expressa principalmente a nível dos condrócitos das camadas superficial e de transição, sendo capaz de processar várias proteínas da matriz (Sandell & Aigner, 2001).

À semelhança das gelatinases, as catepsinas B, D, K e L presentes nos lisossomas dos condrócitos também participam na degradação dos subprodutos das MMPs e ADAMTS (Goldring, 2000). A catepsina B está presente nas regiões onde ocorre a formação de nova matriz, enquanto a K e L se expressa mais a nível subcondral em zonas de inflamação ou de remodelação óssea (Sandell & Aigner, 2001).

Os TIMPs 1-4 atuam na inibição das MMPs, apresentando também especificidade para a família das ADAMTS. Ambos os TIMP-1 e 3 são capazes de inibir os ADAMTS envolvidos na patogenia da DDA, sendo o TIMP-3 aquele que promove a inibição mais eficaz (Kevorkian et al, 2004). Durante a DDA, a TIMP-1 encontra-se muito aumentada, servindo como um índice da ativação das MMPs. A síntese destas moléculas inibidoras não acompanha no entanto o aumento da concentração de proteinases ativas (Lin et al, 2004).

Apesar dos condrócitos e as suas proteases serem considerados os principais protagonistas da DDA, numa fase inicial a sua função é estimulada principalmente por citocinas e leucotrienos produzidos na membrana sinovial e difundidos até à cartilagem articular (Pelletier et al, 2001; Malesud, 2004). Nesta altura os condrócitos tornam-se reativos aumentando a sua expressão génica das MMPs, iniciando também eles a produção de mediadores inflamatórios como o ON,  $PGE_2$ , e diversas citocinas entre as quais a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), e TNF-  $\alpha$  (Malesud, 2004). Estes mediadores inflamatórios contribuem não só para o balanço catabólico como para a estimulação das vias nociceptivas durante a DDA (Lee et al, 2013).

O resultado da interação entre as citocinas, os antagonistas, os fatores de crescimento com origem nas células sinoviais e nos condrócitos reativos, é determinante na degradação da ME e na supressão da função sintética dos condrócitos (Pelletier et al, 2001).

A IL-1 $\beta$  e o TNF-  $\alpha$  são as principais citocinas intervenientes na DDA, estimulando as células sinoviais a produzir proteases e outras citocinas entre as quais a IL-6, IL-8, fator inibidor de leucócitos (LIF) e  $PGE_2$  (Goldring, 2000; Pelletier et al, 2001).

A IL-1 $\beta$  é sintetizada na forma de um precursor inativo, sendo depois convertida na sua forma ativa pela enzima caspase 1 ou enzima de conversão da IL-1 $\beta$  (ICE). Durante a DDA a concentração da ICE encontra-se aumentada nas células sinoviais e nos condrócitos. A modulação das atividades da IL-1 é feita por dois tipos de receptores específicos: IL-1R tipo

I e IL-tipo II, ambos responsáveis pela transdução de sinal na superfície celular. O receptor tipo I é o que apresenta uma maior afinidade para a IL-1 $\beta$  e encontra-se aumentado em condrócitos e sinoviócitos durante a DDA, explicando a hipersensibilidade das células a esta citocina. Ambos os tipos de receptores IL-1R podem libertar-se da superfície celular passando a designar-se por receptores IL-1 solúveis (sIL-1R), comportando-se como antagonistas da citocina por preservarem a sua região de ligação. Existe ainda outra molécula envolvida na modelação da patogenia da IL-1, que atua como um antagonista dos receptores IL-1R, a IL-1Ra. Apesar deste antagonista se encontrar aumentado durante a DDA, a sua quantidade não é suficiente para contrariar os efeitos da também aumentada IL-1 $\beta$  (Pelletier et al, 2001).

O TNF- $\alpha$  participa potenciando a inflamação, o catabolismo da membrana sinovial, e induzindo atividades osteoclásticas podendo por isso estar envolvido em processos de remodelação do osso subcondral (Pelletier et al, 2001). Os neurónios sensitivos possuem receptores para o TNF- $\alpha$ , possibilitando uma ativação direta por parte desta citocina que assim contribui para o desenvolvimento de dor neuropática (Lee et al, 2013). Esta molécula é sintetizada numa proforma que apenas se torna ativa na superfície celular por ação proteolítica da enzima de conversão do TNF $\alpha$  (TACE) pertencente à família das adamalisinases. À semelhança do que ocorre com a ICE, a expressão génica da TACE também se encontra aumentada durante o fenómeno da DDA. Após ativação o TNF- $\alpha$  liga-se a receptores específicos (TNFR) com maior expressão durante a DDA. A clivagem proteolítica das porções extracelulares destes receptores origina receptores solúveis (sTNFRs) com efeitos mistos na função do TNF- $\alpha$ , diminuindo a sua bioactividade quando em maior quantidade, ou aumentando o seu tempo de semi-vida quando presentes em menor concentração. Uma vez que durante a DDA os níveis de sTNFRs se encontram diminuídos, estes acabam por promover a potenciação dos efeitos catabólicos do TNF $\alpha$ . (Pelletier et al, 2001).

O ON é outro factor catabólico por excelência, produzido em grandes quantidades pelos condrócitos no decurso da DDA devido à catalisação por parte da forma induzida da enzima Sintetase de Monóxido de azoto (iNOS). Os efeitos do ON a nível da DDA incluem a inibição da síntese de algumas macromoléculas da matriz como os agrecanos, o aumento da atividade das MMPs, a diminuição da síntese de IL-1Ra pelos condrócitos, e a indução da morte celular (Pelletier et al, 2001). A cartilagem degenerada apresenta um maior número de condrócitos em apoptose comparativamente com a cartilagem saudável, pelo que a produção de ON é determinante na patogenia da DDA (Innes, 2012).

O estado pro-inflamatório da articulação também se caracteriza pela produção de numerosos produtos das cicloxigenases (COX), entre os quais a PGE<sub>2</sub>, a prostaglandina D2 (PGD<sub>2</sub>), a prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ), o tromboxano e a prostaglandina I2 (PGI<sub>2</sub>). Estes



agentes potenciam a produção de MMPs e inibem a síntese de agrecanos e colagénio, além de também estimularem a apoptose dos condrócitos.

Desta família de mediadores a PGE<sub>2</sub>, produto da ciclooxigenase-2 (COX-2), produzida em grande quantidade por condrócitos reativos, células sinoviais e osso subcondral, é o principal responsável pela dor de origem inflamatória em situações de artrite (Piermattei et al, 2006; Pelletier et al, 2001). Esta ação é mediada por receptores prostanoídes do tipo E (EP) existentes ao nível dos neurónios sensoriais periféricos e da medula espinal. (Lee et al, 2013). Estudos *in vitro* demonstraram a existência de uma sinergia entre a IL-1 e a PGE<sub>2</sub> que resulta no aumento da expressão IL-6 e iNOS (Lee et al, 2013).

Os produtos da lipoxigenase (LOX) também se encontram aumentados no líquido sinovial de doentes com DDA, nomeadamente o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e o leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), ambos capazes de estimular a produção de IL-1β pelas células sinoviais (Pelletier et al, 2001). Os leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> (LT D<sub>4</sub>), e E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) são compostos proinflatórios de ação mais direta, enquanto o LTB<sub>4</sub> é um potente agente quimiotático capaz de atrair neutrófilos e outras células inflamatórias que irão contribuir para a reação inflamatória. A combinação deste leucotrieno com a presença de polimorfonucleares neutrófilos encontra-se associada ao desenvolvimento de hiperalgisia (Innes, 2012).

Também as interleucinas 6, 8, 17, 18, oncostatina M (OSM) e LIF se encontram aumentadas no fluido sinovial de doentes com DDA. Destes, o LIF estimula a reabsorção de PGs, a síntese de MMPs e de ON pelos condrócitos, e potencia a estimulação do TNF-α sobre a síntese de PGE<sub>2</sub> (Goldring, 2000), enquanto a OSM exerce uma forte sinergia com a IL-1 na estimulação da destruição de colagénio e PG (Goldring, 2000).

Existe uma relação entre o aumento de IL-6 no líquido sinovial e a presença de efusão articular, sinovite e degenerescência articular (Pearle et al, 2005), já que esta IL provoca um aumento das células inflamatórias na membrana sinovial, e potencia o efeito que a IL-1 exerce a nível da síntese de MMPs (aumenta) e de PGs (diminui) (Pearle et al, 2005). A presença de um receptor solúvel (sIL-6Rα) reforça os efeitos inibitórios da IL-6 sobre a síntese de PGs. Esta IL também exerce funções conservativas nomeadamente através da estimulação da expressão de TIMPs. De facto, a deficiência em IL-6 induzida em alguns modelos animais traduziu-se numa maior perda de PGs em algumas formas de artrite. (Goldring, 2000). Pensa-se por isso que esta citocina também possa estar envolvida no mecanismo de retroalimentação que limita a atividade das MMPs (Pelletier, 1998).

Além de actuar em sinergia com o TNF-α (Goldring, 2000), a IL-8 é responsável por atrair células inflamatórias através de quimiotaxia, e por estimular a libertação de radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e enzimas lisossómicas por parte de neutrófilos (Symons et al, 1992).

A IL-17 estimula a síntese de IL-6 e IL-8 por parte das células sinoviais e a libertação de ON pelos condrócitos (Mukundan et al, 1997), Atuando conjuntamente com a IL-18 na

estimulação da produção de MMPs, diminuindo a síntese de TIMPs e também de ME (Sandell & Aigner, 2001).

Parte das citocinas envolvidas na DDA comportam-se como inibidores, antagonistas ou moduladores da atividade dos outros participantes. É o caso das IL-4, 10, 11 e 13, que são produzidas espontaneamente pelas células sinoviais e pelos condrócitos, estando aumentadas no líquido sinovial durante a DDA. Promovem a diminuição da produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e MMPs, a inibição da libertação de PGE<sub>2</sub>, o aumento da expressão dos TIMPs e de IL-1Ra (Pelletier et al, 2001; Goldring, 2000), e algumas como a IL-10 também são capaz de inibir a síntese de IL-1, IL-6 e IL-8 (Pelletier et al, 2001). A IL-11 atua através de um receptor que apresenta homologias com os receptores de IL-6 e LIF, motivo pelo qual pode desencadear ações associadas a estas citocinas, como por exemplo a síntese de TIMPs (à semelhança da IL-6), sem no entanto aumentar a expressão das MMPs. Também reduz ativação das COX-2 e a síntese de PGE<sub>2</sub>, bem como a quantidade de receptores TNF-R (Goldring, 2000). A IL-13 inibe a expressão e síntese de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e MMP-3, e aumenta a produção de IL-1Ra (Jovanovic et al, 1996). Ao nível da cartilagem o Interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) também pode ser considerado um interveniente inibitório no catabolismo da DDA, uma vez que em culturas celulares inibe a resposta dos condrócitos expostos a citocinas catabólicas. No entanto esta molécula também se mostra capaz de inibir a síntese de constituintes da matriz (Goldring, 2000).

Os mecanismos de regulação dos fatores de crescimento encontram-se alterados durante a DDA como fruto do balanço de todas as reações que concorrem para a evolução da doença. O TGF $\beta$  está identificado como sendo um inibidor da libertação de proteases pelos condrócitos e um estimulador da síntese de TIMPs. No entanto, estudos *in vitro* demonstram que este factor de crescimento pode apresentar uma dualidade de efeitos, estimulando ou inibindo a síntese de PGs e de colagénio do tipo II (Goldring, 2015). Quando em concentração elevada também provoca a inibição dos condrócitos da zona superficial (Becerra et al, 2010).

Durante a DDA a capacidade de resposta à IGF-1 por parte dos condrócitos encontra-se diminuída apesar dos níveis deste factor se encontrarem normais ou aumentados, e dos níveis de receptores IGF e de proteínas de ligação se encontrarem aumentados (Goldring, 2015). Uma explicação é a acumulação local de moléculas com potencial para se ligar a estes fatores tróficos como é o caso da Decorina. A concentração de factor de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2) está aumentada na DDA devido a uma libertação suprafisiológica. Este factor é capaz de ativar muitas vias de transdução e sinalização alterando a expressão génica das células, resultando na diminuição da síntese de PGs e no aumento da expressão de MMP-13, e também no antagonismo contra factores de crescimento como o IGF-1 e a BMP-7 (Lee et al, 2013).

#### **2.2.1.4- O Fenómeno da Dor na DDA**

Clinicamente a dor é o sinal mais proeminente da DDA sendo particularmente debilitante durante os períodos de agudização, traduzindo-se numa menor utilização da articulação afetada e na redução da qualidade de vida do doente. Contrariamente ao que ocorre em condições agudas, a dor crónica prolonga-se no tempo podendo ser considerada um sinal de doença por si só (Lee et al, 2013).

Sempre que a articulação é mobilizada, o alongamento e a compressão da cápsula articular inflamada origina dor. A presença de efusões articulares exacerba os sinais álgicos durante a flexão articular, já que a redução do espaço articular livre faz com o que o fluido comprima a cápsula internamente (Todhunter, 2006). A membrana sinovial aparenta ser um tecido chave na nociceção articular, no entanto, na fase final onde a doença se caracteriza pela erosão da cartilagem e fibrose capsular, é o osso subcondral o principal responsável pela ativação das vias de percepção da dor (Innes, 2012). Na DDA a dor envolve mecanismos a nível do sistema nervoso periférico e central, e a sua interação com as reações dos tecidos osteoartíticos (Lee et al, 2013). Os mediadores químicos envolvidos na nociceção incluem as prostaglandinas, os leucotrienos, a substância P, as bradicininas (Todhunter, 2006), o neuropeptídeo Y, a histamina e a serotonina. Tais substâncias diminuem o limiar de percepção de dor e fazem o recrutamento de fibras-C nociceptivas que se encontravam até então inativas, e se tornam sensíveis a estímulos mecânicos da articulação inflamada. Os mediadores inflamatórios são por isso determinantes na modulação da nociceção dos tecidos sinoviais (Innes, 2012). Os sinais álgicos são transmitidos através de vias espinais distintas, alcançando o gânglio da raiz nervosa dorsal a partir do qual viajam até ao trato espinotalâmico, alcançando os núcleos nervosos corticais onde são processados (Lee et al, 2013). O recrutamento progressivo de fibras-C resulta no aumento da ativação sináptica dirigida à espinal medula (Innes, 2012), levando a alterações nas vias nervosas que se tornam hipersensíveis a estes estímulos e resistentes a sinais antinociceptivos. Esta ativação constante pode acabar por ficar embutida na medula espinal funcionando como uma memória da dor (Fox & Millis, 2010). A sensibilização central funciona como um fator de progressão das alterações articulares, podendo a sua modulação resultar na diminuição da doença (Innes, 2012).

### **3- O Doente com DDA: Diagnóstico Clínico e Complementar**

Nos Estados Unidos um médico veterinário de clínica geral avalia aproximadamente 45 casos de canídeos com DDA por mês. O paciente típico é normalmente um indivíduo com uma idade média a avançada (> 4 anos de idade), de raça grande (> 22,5 kg), e com excesso de peso ou obesidade (Innes, 2012). Algumas raças são particularmente mais

afetadas, nomeadamente por serem predispostas a outras doenças capazes de secundariamente originar DDA como por exemplo a displasia de anca, displasia de cotovelo, e a RLCC (Abercromby, Innes, May; 2006).

A maioria dos animais é apresentada à consulta apenas quando os sinais clínicos se tornam óbvios e persistentes, podendo já se verificar um estado avançado da doença. Nas situações em que a DDA surge de forma secundária a outra alteração, as manifestações clínicas mais evidentes podem dever-se numa fase inicial à causa primária, acabando a DDA por assumir esse protagonismo mais tarde com a perpetuação da condição (Innes, 1995).

### **3.1- Diagnóstico Clínico**

Os sinais clínicos dependem de diversos factores entre os quais o temperamento do paciente, a sua raça, o grau de doença e a articulação afectada. Por ser uma doença degenerativa, a intensidade da sintomatologia varia desde ligeira e intermitente, a grave e persistente, com tendência para piorar gradualmente e a um ritmo variável na maioria dos pacientes, entre períodos de remissão e de agudização (Innes, 2012).

Os proprietários descrevem a presença de sinais clínicos como: o desenvolvimento de claudicações, relutância ao exercício, atrofia muscular, letargia, inapetência ou anorexia, alterações de temperamento, lambedura ou mordidela das articulações afetadas, inquietação, insónias, procura de locais mais quentes e camas confortáveis, dificuldade em adoptar a posição de defecação, e incapacidade em saltar (Fox & Millis, 2010).

Normalmente os proprietários apenas reconhecem uma claudicação quando há assimetria na marcha, o que pode não ocorrer nos animais que desenvolvem DDA bilateralmente. A referência ao facto de alguns animais passarem a fazer andamentos mais curtos e forçados é comum, estando associada à redução da amplitude de movimento articular (Range of Motion - ROM) devido à presença de fibrose capsular e osteófitos (Fox & Millis, 2010). Estudos realizados com placas de força mostraram que no período de pós-exercício físico os picos de força aplicados por canídeos com DDA se encontram significativamente reduzidos (Innes, 2012). No entanto, os cães raramente perdem a capacidade de suportar o seu peso por responsabilidade exclusiva da DDA (Fox & Millis, 2010).

Alguns canídeos podem não vocalizar o seu desconforto podendo levar os proprietários a pensar que o seu animal não apresenta dor (Fox & Millis, 2010). Factores externos como o nível de atividade física e o clima, podem também influenciar a intensidade dos sinais que o proprietário refere (Innes, 2012), podendo alguns cães manifestar mais desconforto nos dias frios, e outros ao retomarem a marcha após períodos de repouso, sendo frequente nesta situação que os animais melhorem com o “aquecimento” das articulações (Fox & Millis, 2010).

Recentemente surgiu o interesse em formalizar e validar questionários destinados aos proprietários, com o objetivo de facilitar monitorização da progressão da doença e as respostas dos indivíduos à terapêutica. No entanto ainda não existe nenhum questionário específico para a DDA já validado (Innes, 2012).

Durante a consulta também pode ser possível avaliar alguns dos sinais descritos pelos proprietários, tais como a rigidez postural, a claudicação ou as alterações de marcha (Abercromby *et al.*, 2006). Na suspeita de DDA o exame ortopédico deve sempre fazer parte da avaliação clínica, assim como exame neurológico já que permite a identificação ou exclusão de alterações de origem neuropática (Fox & Millis, 2010). A manipulação articular pode revelar crepitação, dor, fibrose, efusão, e redução do ROM. A avaliação do ROM deve ser feita por comparação com os valores de referência e com a amplitude da articulação contra lateral, além da experiência do clínico (Innes, 2012).

Tabela 1- Amplitudes articulares caninas normais.		
	Amplitude	
Articulação	Flexão	Extensão
Ombro	57°	165°
Cotovelo	36°	166°
Campo	32°	196°
Anca	50°	162°
Joelho	41°	162°
Tarso	38°	165°
Adaptado de Innes, 2012		

### 3.2- Exames Complementares de Diagnóstico

Alguns doentes em fase avançada da doença permitem o diagnóstico fácil da condição, no entanto a capacidade para detectar as alterações iniciais e possíveis causas primárias podem implicar o recurso a técnicas e exames complementares. O diagnóstico precoce da DDA permite definir estratégias no sentido controlar e abrandar o processo degenerativo no seu começo (Innes, 1995).

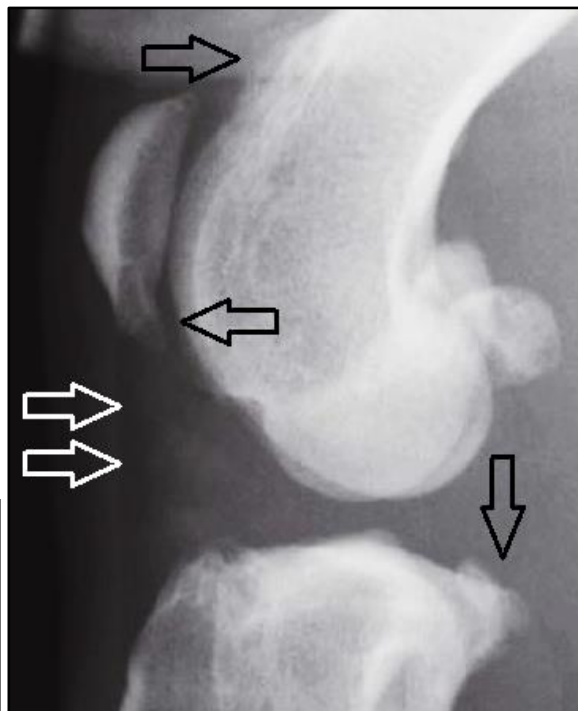
1) Radiografia - Após a identificação do foco de claudicação, o recurso a radiografia (digital ou não) permite obter informações mais concretas sobre as alterações morfológicas da zona de interesse (Fox & Millis, 2010). O padrão radiográfico da DDA varia entre indivíduos e articulações (Innes, 1995), sendo as alterações mais comuns a presença de osteófitos, esclerose subcondral, diminuição do espaço articular e remodelação óssea dos bordos articulares. Os osteófitos desenvolvem-se normalmente na periferia da superfície articular,

sendo visíveis radiograficamente em torno desta como elevações de osso neoformado. Quando os osteófitos se desenvolvem a nível das inserções ósseas da cápsula ou ligamentos, recebem a designação de entesófitos (Fox & Millis, 2010).

O espaço articular corresponde à região com opacidade de tecido mole situada entre os ossos subcondrais opostos, onde estão presentes as duas camadas de cartilagem articular separadas por um microfilme de líquido sinovial. Em fases agudas da doença o desenvolvimento de efusões articulares pode provocar o aumento deste espaço, estando no entanto a progressão da DDA associada à sua diminuição (Allan, 2002). A severidade do desconforto pode não ser consistente com o grau de alterações radiográficas (Johnston et al, 2008), sendo no entanto os osteófitos o parâmetro mais relacionado (Fox & Millis, 2010).

O osso subcondral pode apresentar alterações que incluem eburnação, alisamento ou deformação (Fox & Millis, 2010), que se traduzem na prática num aumento da radiopacidade do osso subcondral que pode atingir 1 a 2 mm de espessura. A presença de quistos subcondrais também pode ocorrer ocasionalmente nos cães em estado avançado de doença (Allan, 2002). Outras alterações podem incluir a presença de efusão articular, edema peri-articular, erosão do osso subcondral, deformação da articulação, lesões líticas nas zonas de inserção da cápsula articular e ligamentos, calcificação de meniscos, e anquilose parcial ou total da articulação (Fox & Millis, 2010; Innes, 1995).

Imagem 1- Radiografia latero-lateral do joelho de um canídeo com DDA.



Osteofitose a nível do bordo proximal da tróclea femoral, bordo distal da patela e caudalmente ao *plateau* tibial (setas pretas); Efusão articular comprimindo a almofada adiposa infrapatelar (setas brancas). Adaptado de Innes, 2012

2) Artrografia - As artrografias com meios de contraste podem permitir visualizar com mais detalhe estruturas intra-articulares como a cartilagem e a membrana sinovial. A substância de contraste positivo recomendada é o iohexol, o qual é infiltrado diretamente no espaço articular. O dióxido de carbono pode ser utilizado como um meio de contraste negativo devendo ser injetado através de um filtro *Millipore*, para assegurar que não ocorre contaminação sinovial (Allan, 2002). A utilização desta técnica encontra-se descrita para avaliar a distensão real da cápsula articular (Farrow, 2003).

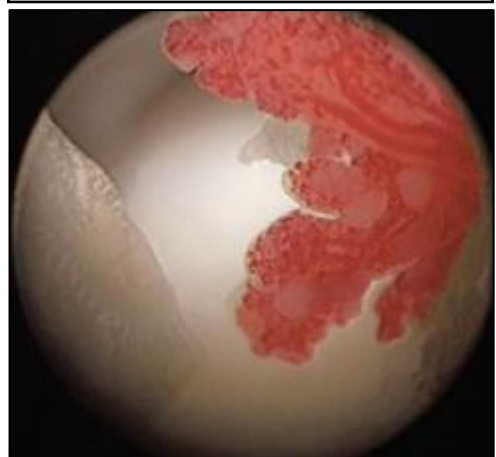
3) Tomografia Computorizada - Apesar de fornecer excelentes informações acerca de alterações ósseas, este exame é menos útil na detecção de modificações nos tecidos moles. Por este motivo a tomografia computadorizada (TC) não recebe muita atenção enquanto meio de diagnóstico e prognóstico de DDA. A TC de contraste positivo pode no entanto ser útil na avaliação de articulações de maior complexidade como os cotovelos, carpos e tarsos, sendo muito eficaz a evidenciar osteófitos que podem estar mascarados na TC simples (Innes, 2012).

4) Ressonância Eletromagnética - Comparativamente com a TC, a ressonância eletromagnética é um exame mais sensível às alterações da DDA por fornecer mais informação acerca dos tecidos moles como a cartilagem, meniscos, ligamentos, membrana sinovial e também do tecido ósseo. No entanto a cartilagem articular canina pode ser tão fina que mesmo alguns dos aparelhos mais potentes podem não conseguir gerar a sua imagem precisa. O exame acaba por não ser muito utilizado devido às frequentes restrições económicas verificadas no contexto da medicina veterinária (Innes, 2012).

5) Ultrassonografia – Embora não seja um exame de imagem muito utilizado para avaliar as articulações, é particularmente eficaz na avaliação dos tecidos periarticulares, em particular as estruturas tendinosas. Com esta técnica pode ser possível avaliar a quantidade e a natureza do fluido sinovial, bem como localizar zonas de mineralização periarticulares (Fox & Millis, 2010). As suas principais limitações são a hiperecogenicidade do osso que limita o acesso à maioria da cavidade articular (Colin, 1997).

6) Artroscopia - É uma técnica cada vez mais utilizada em ortopedia de pequenos animais, representando um dos exames mais eficazes no que respeita à classificação do grau de DDA (Innes, 2012). Ao permitir a visualização e amplificação das superfícies articulares, cápsula e estruturas sinoviais,

Imagem 2- Artroscopia.



A massa avermelhada com aspecto de couve-flor corresponde à proliferação da íntima sinovial, característica de sinovites e da DDA. Adaptado de Fox, 2010

torna possível diagnosticar o aparecimento de lesões mais precocemente e antes do desenvolvimento de alterações visíveis ao raio-x. A artroscopia pode estar associada a complicações como o trauma articular iatrogénico, cujo nível de incidência reflecte experiência do clínico. A formação específica e a experiência técnica são por isso factores essenciais à correta realização deste ato médico (Innes, 2012).

7) Cintigrafia - A cintigrafia articular através de tecnécio combinado com difosfonato é uma modalidade que permite obter informação acerca dos processos de remodelação óssea associados à DDA. No homem está descrito o valor do exame na previsão da progressão da perda de cartilagem articular, mas esses estudos ainda não foram realizados em cães (Innes, 2012)

8) Artrocentese - Quando existem dúvidas em relação à causa de uma alteração articular, a colheita e análise de fluido sinovial pode fornecer informações adicionais sobre a etiologia. Um dos principais objectivos do exame é realizar a contagem diferencial de células existentes no esfregaço, permitindo assim a distinção entre processos inflamatórios e não inflamatórios (Innes, 2012). Condições articulares agudas e inflamatórias podem provocar o aumento do volume de sinóvia, enquanto em processos crónicos e não inflamatórios a tendência é para haver menor produção de líquido sinovial. A contagem total de células do fluido sinovial da DDA encontra-se normalmente aumentada, com predominância de células mononucleares, e uma quantidade de polimorfonucleares neutrófilos normal ou ligeiramente aumentada (Center, 2012). A viscosidade do líquido sinovial encontrando-se normalmente ligeiramente diminuída na DDA (Innes, 1995).

Tabela 2- Contagens Celulares Características de Líquido Sinovial Fisiológico e de Articulações Patológicas.

Condição	Total	% Células Mononucleares	% Neutrófilos
Normal	$<2 \times 10^9/L$	94 - 100	0 - 6
DDA	$2 - 5 \times 10^9/L$	88 - 100	0 - 12
Artrite Reumatóide	$8 - 38 \times 10^9/L$	20 - 80	20 - 80
Artrite Imunomediada não erosiva	$4 - 370 \times 10^9/L$	5 - 85	15 - 95
Artrite Infecciosa	$40 - 267 \times 10^9/L$	1 - 10	9 - 100
Adaptado de Innes, 2012			

A coloração da amostra pode variar desde transparente ou amarela clara, a hemorrágica ou xantocrômica, que é uma coloração amarela-alaranjada resultante da degradação de hemoglobina, e que permanece durante algum tempo após um episódio de efusão hemorrágica (Center, 2012). A presença de fragmentos cartilagíneos, condrócitos e osteoclastos pode indicar destruição articular severa (Center, 2012).



#### **4- Terapêutica da DDA**

Durante muitos anos a abordagem à dor era feita com recurso a um único fármaco, e frequentemente apenas quando o animal demonstrava perante o clínico estar em sofrimento (Fox & Millis, 2010c). Os avanços no conhecimento relativo à fisiologia da DDA geraram o interesse em melhorar os protocolos terapêuticos convencionais, com a introdução de novas técnicas e de fármacos mais seguros e eficazes no controlo da dor e na manutenção da função articular, assim como o controlo de factores ambientais como o peso, a alimentação e o exercício físico (Piermattei et al, 2006).

##### **4.1- Fatores Ambientais e Reabilitação Física**

A fisioterapia e a reabilitação física associadas à perda de peso podem ser tão ou mais eficazes que uma abordagem farmacológica (Fox & Millis, 2010d).

A obesidade é um factor predisponente para a DDA, quer por alteração da biomecânica articular e aumento da sua entropia, quer através da síntese de moléculas pro-inflamatórias por parte dos adipócitos (Fox & Millis, 2010c). Diversas hormonas incluindo a leptina, a adiponectina e um diverso leque de adipocinas são sintetizadas pelos adipócitos de cães e de humanos. Entre estas adipocinas encontram-se algumas das moléculas apresentadas anteriormente como intervenientes no catabolismo da DDA, como o TNF- $\alpha$ , IL-6, 8 e 10 (Fox & Millis, 2010c; Guilak, 2011). Um estudo realizado em cães obesos com DDA coxo-femoral revelou que perdas de peso na ordem dos 11 a 19% permitiram reduzir significativamente o grau de claudicação do membro posterior (Johnston et al, 2008).

O doente com DDA é muitas vezes relutante ao exercício, podendo a causa desta aversão ser a ausência de vontade devido à presença de dor ou uma verdadeira incapacidade provocada pelas alterações morfológicas. A dor é passível de ser abordada farmacologicamente, enquanto a incapacidade se deve normalmente à condição de atrofia muscular e diminuição do ROM que caracterizam a DDA. Consideranto tal, os doentes incapazes de se exercitar são o principal grupo alvo da reabilitação física (Fox & Millis, 2010d). Algumas das técnicas de reabilitação utilizadas em doentes com DDA incluem as massagens, aplicação de calor húmido, mobilização articular passiva, ultrassons, laser médico e estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) (Johnston et al, 2008).

Regimes de mobilização específicos podem melhorar a longo prazo as propriedades biomecânicas da cartilagem articular, estimulando o seu metabolismo e síntese molecular (Buckwalter et al, 2005), enquanto períodos de imobilização prolongados diminuem estes parâmetros (Shulz, 2013). O aumento do nível de exercício deve ser gradual e adaptado ao doente, de modo a evitar o exacerbatamento dos sinais clínicos (Innes, 2012). Os exercícios de baixo nível de impacto são os ideais como caminhadas, corridas lentas, natação, subir

escadas e rampas. A hidroterapia é muito recomendada a doentes com DDA por estimular a realização de movimentos com uma amplitude completa num ambiente onde as articulações estão sujeitas a menos peso. Além disso também estimula a utilização dos 4 membros em simultâneo e não apenas os menos dolorosos (Johnston et al, 2008).

#### **4.2- Nutracêuticos**

A seguir aos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), os nutracêuticos são o grupo de produtos farmacêuticos que apresenta um maior crescimento na Medicina Humana e Veterinária (Fox & Millis, 2010d). No que respeita à DDA estes produtos são vistos agentes modificadores da doença, não sendo no entanto considerados medicamentos. O controlo e testagem que precedem a introdução dos nutracêuticos no mercado não são por isso tão rigorosos como os de um medicamento (Fox & Millis, 2010d), não existindo por vezes a certeza acerca do seu conteúdo exato nem da biodisponibilidade das substâncias ativas (Piermattei et al, 2006). É importante avaliar as evidências em torno da eficácia de cada uma destas moléculas, evitando a tentação de as rotular todas como boas ou más (Innes, 2012). Vejamos alguns desses exemplos em particular:

1) Sulfato de Condroitina - Tem uma ação antiquimiotática sobre os neutrófilos reduzindo a sua atividade fagocitária e a libertação de enzimas lisossómicas (Innes, 2012). Em estudos com cartilagem articular e tecido sinovial de cães, o sulfato de condroitina retardou aumento da expressão de MMPs, inibiu a degradação de colagénio do tipo II mediada pela IL-1, e aumentou a concentração de AH no líquido sinovial (Fox, 2010). Estudos com ratinhos revelaram propriedades anti-inflamatórias e a redução da formação de edemas (Innes, 2012). A sua biodisponibilidade após administração oral é altamente influenciada pelo peso molecular da molécula (Fox, 2010). Alguns estudos apontam para a sua distribuição na cartilagem articular de cães, enquanto outros indicam que a sua deposição ocorre apenas a nível da cartilagem episiária. A possibilidade do sulfato de condroitina fornecido por via oral não alcançar a cartilagem articular continua por isso a ser real (Innes, 2012).

2) Glucosamina - Formulada na forma de sulfato ou cloridrato de glucosamina, a sua presença é detectada a nível sistémico e articular após terapêutica oral em humanos com DDA (Fox, 2010). As suas ações *in vitro* incluem a redução da degradação de PG, e a inibição de agrecanases, MMPs e de mediadores inflamatórios como o ON e PGE<sub>2</sub>. Também exercem efeitos anabólicos estimulando a síntese de GAGs e PGs (Fox, 2010), tendo sido sugerido em humanos que ao aumentar a síntese de GAGs, a glucosamina induz a produção de proteína nuclear de agrecanos e a montagem destes PGs. No entanto, outro estudo laboratorial com condrócitos caninos demonstrou alguns efeitos prejudiciais na viabilidade das células e na síntese de GAGs (Innes, 2012).

3) Ácidos Gordos Essenciais – São ácidos gordos polinsaturados, que contêm mais do que uma dupla ligação carbono-carbono na sua estrutura. Dois dos principais elementos deste grupo são o ácido linoleico (n-3) e  $\alpha$ -linolenico (n-6). A designação “n-” diz respeito à posição da primeira dupla ligação em relação ao átomo de carbono na extremidade inicial da cadeia (carbono ômega). Alguns ácidos gordos essenciais, nomeadamente o AA (n-6) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) (n-3) são constituintes das membranas celulares, atuando como precursores da família de hormonas eicosanoides (Innes, 2012). A

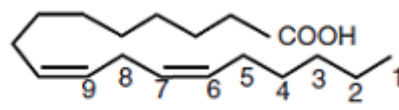
quantidade e os tipos de eicosanoides produzidos após lesão celular são determinados pela disponibilidade dos seus precursores, sendo que os derivados do AA (o mais abundante na membrana celular) são pro-inflamatórios e os do EPA não o são, ou apresentam uma atividade inflamatória mínima (Fox & Millis, 2010d). O AA e EPA podem ser formados a partir do ácido linoleico e  $\alpha$ -linolénico respectivamente (Innes, 2012). A suplementação com ácidos gordos essenciais fundamenta-se por isso na possibilidade de aumentar a quantidade de ácidos gordos n-3 membranares em prol dos n-6, através da suplementação com ácido  $\alpha$ -linolénico (Johnston et al, 2008). Os ácidos gordos n-3 também promovem uma redução do mRNA das ADAMTS-4, 5, MMP-3,13, assim como das citocinas inflamatórias TNF-  $\alpha$  ,IL-1 $\alpha$ , e 1 $\beta$  (Innes, 2012). Estudos com cães alimentados com dietas ricas em ácidos gordos n-3 revelaram que esta foi capaz de influenciar a constituição do líquido sinovial, promover a diminuição das MMPs e o aumento dos TIMPs, permitindo melhorias na qualidade de vida e função motora a longo prazo (Innes, 2012).

#### 4) Mexilhão dos Lábios Verdes

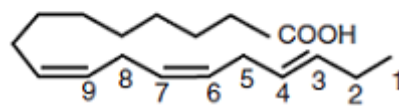
Originário da Nova Zelândia é utilizado no tratamento da DDA por ser rico em nutrientes como o sulfato de condroitina, vitaminas B6, C e E, minerais e ácidos gordos essenciais n-3 (Björkman et al. 2007; Whitehouse *et al.*, 1997). Quatro estudos avaliaram as propriedades terapêuticas de preparações feitas à base deste mexilhão em cães com DDA, tendo três deles sugerido melhorias ligeiras a moderadas e outro de que não houve diferenças entre o grupo que recebeu o tratamento e o grupo placebo (Johnston et al, 2008).

Outros nutracêuticos têm vindo a ser utilizados no tratamento da DDA, como por exemplo os lípidos insaponificáveis de Abacate/Soja, o extrato de açafrão (curcuminas) e a Ficocianina, possuindo já estudos que sugerem ou comprovam a sua utilidade nesta condição.

Figura 11- Ácidos gordos polinsaturados (linoleico e  $\alpha$ -linolénico)



Ácido linoleico (n-6)



Ácido  $\alpha$ -linolénico (n-3)

Adptado de Buffington, Holloway & Habood. 2004

### **4.3- Terapia Medicamentosa Sistêmica**

O desenho de um protocolo medicamentoso deve ter apenas a duração necessária, e os fármacos devem ser utilizados sempre na menor dose possível (Piermattei et al, 2006).

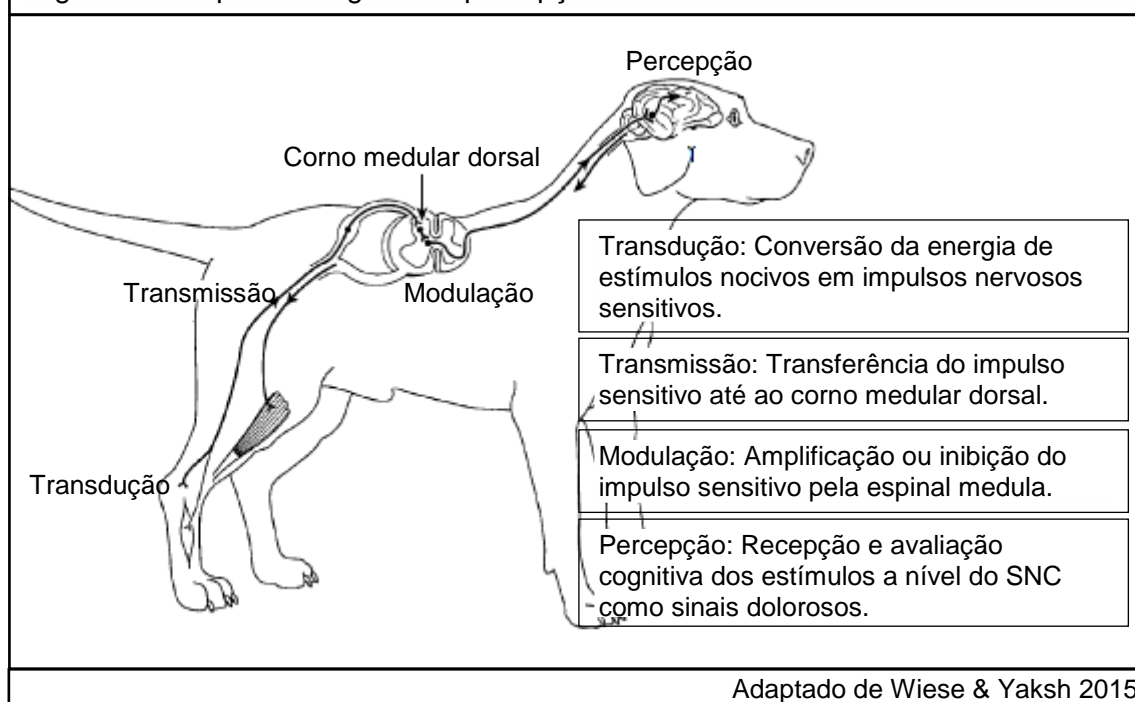
A maioria dos fármacos utilizados na DDA visam modular a sintomatologia nomeadamente através da redução da dor e do desconforto, não participando diretamente no combate à etiologia da doença (Piermattei et al, 2006). Outros têm o potencial para retardar, parar ou reverter as alterações morfológicas que ocorrem nos tecidos articulares podendo ser utilizados com essa finalidade em associação com os fármacos moduladores de sintomas (Innes, 2012).

Os fármacos utilizados no tratamento da DDA podem assim ser classificados em 1) Moduladores da sintomatologia, e 2) Moduladores das Alterações estruturais (Innes, 2012; Piermattei et al, 2006).

#### **4.3.1- Fármacos Moduladores da Sintomatologia**

Atualmente os Médicos Veterinários reconhecem que o fenómeno da dor envolve uma grande diversidade de transmissores e receptores, cada um com a sua dinâmica, mecanismo e modo de ação específico. Desta perspectiva é fácil perceber que não é possível alcançar uma analgesia total recorrendo apenas a um único agente, que pode funcionar através de um único mecanismo (Fox & Millis, 2010d). O conceito de analgesia multimodal é hoje em dia muito aplicado, assentando numa abordagem em várias frentes com recurso a fármacos de classes distintas e diferentes vias de administração, procurando um efeito farmacológico sinérgico ou aditivo. Torna-se assim possível a utilização de doses mais baixas de cada fármaco, o que potencialmente reduz a ocorrência de efeitos adversos. A seleção de fármacos é ótima quando colectivamente conseguem bloquear as quatro etapas fisiológicas da percepção de dor: a transdução; transmissão; modulação; percepção (Fox & Millis, 2010d). A medicação a utilizar é determinada pelo grau de desconforto e de disfunção articular, e não por avaliação radiográfica (Piermattei et al, 2006).

Figura 12- Etapas fisiológicas da percepção de dor.



### 1) Anti-Inflamatórios Não Esteróides (AINEs)

Esta classe de fármacos é uma das mais utilizadas na clínica de canídeos existindo um vasto leque de AINEs aprovados para esta espécie (Innes, 2012). A nível da DDA formam o pilar da maioria dos protocolos terapêuticos pelas suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (Innes, 2012; Fox & Millis, 2010d).

Os ANES inibem a cascata do metabolismo do ácido araquidónico (AA) diminuindo a produção de mediadores eicosanóides durante a DDA através da inibição da função das COX. Este mecanismo inicia-se após a lesão da membrana celular, quando ocorre a libertação de fosfolípidos que por ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> são convertidos em AA, que pode sofrer metabolização pela via das COX ou das lipoxigenases (LOX).

A via das COX origina prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) que sofre conversão para prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), a precursora de todas as prostaglandinas e tromboxanos (Innes, 2012). A atividade das LOX sobre o AA resulta na formação de ácido 5-hidroperoxieicosatetroeinoico (5-HPETE), um composto intermediário da síntese de leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>), que por sua vez é convertido nos leucotrienos B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>), e E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>).

Existem AINEs capazes de inibir as duas isoformas da COX: A forma constitutiva (COX-1), assim designada por estar presente em diversos tecidos onde desempenha funções na manutenção da homeostasia, nomeadamente no trato gastrointestinal, endotélio, rins e células plaquetárias, e a forma induzida (COX-2 por outro lado é considerada a forma induzida da enzima (Innes, 2012), estando mais associada à potenciação da inflamação e da dor, nomeadamente através da produção de PGE<sub>2</sub> (Piermattei et al, 2006). A

conceptualização das COX-1 como “boas” e as COX-2 como “más” não se traduz numa lei geral, sendo importante referir que a COX-2 é constitutiva de alguns tecidos, nomeadamente a nível do renal e encefálico, exercendo também efeitos citoprotetores a nível da mucosa intestinal inflamada. Uma minoria dos doentes pode desenvolver reações adversas a esta inibição que ocasionalmente se revelam sérias (Innes, 2012). Com o evoluir do conhecimento farmacológico começaram a ser feitas tentativas de produzir AINEs com optimização da sua eficácia, e com menos potencial para desenvolver efeitos adversos a nível da cartilagem, do trato gastrointestinal, e tecido renal e hepático (Innes, 2012; Fox & Millis, 2010c).

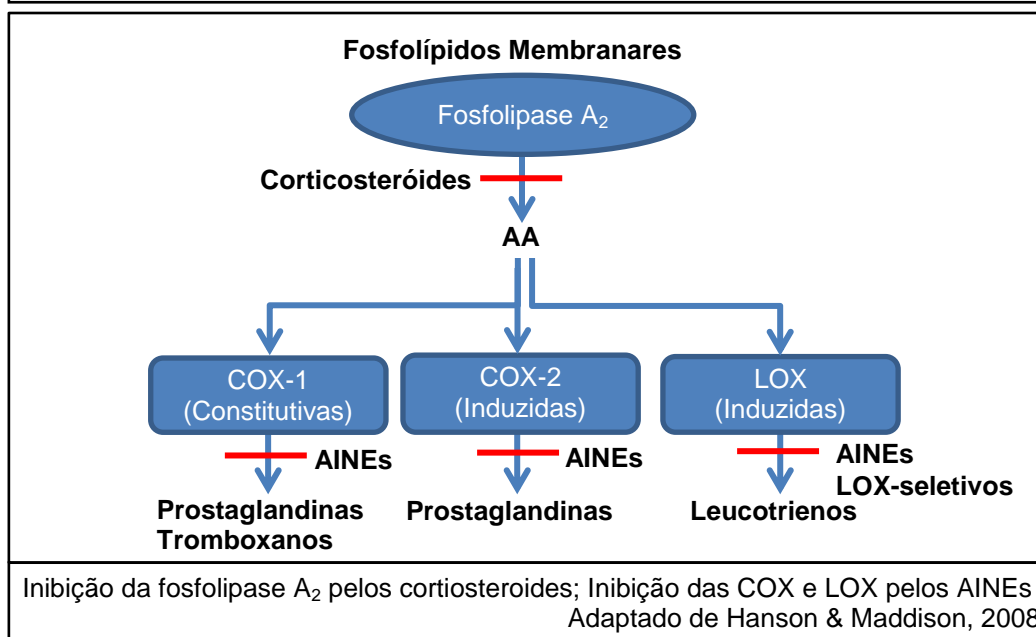
Os AINEs também estão associados a outros mecanismos de ação, como modulação da imunidade celular e humoral, podendo além das prostaglandinas e leucotrienos suprimir a síntese de outros mediadores inflamatórios, e diminuir a resposta estímulos extracelulares por parte das células inflamatórias (Innes, 2012).

O nível de atividade anti-inflamatória do AINE a nível periférico relaciona-se fracamente com o seu potencial analgésico, o que leva a acreditar na existência de outros mecanismos de ação. Esta hipótese foi corroborada quando se verificou ser possível promover analgesia através da administração de doses muito baixas de AINE no espaço subaracnoide. Outros mecanismos de ação central sugeridos incluem além da inibição da síntese de prostaglandinas a interação com receptores opióides, interação com a atividade da serotonina, interferência com aminoácidos excitatórios do sistema nervoso central como a glutamina, e ativação indireta de receptores canabinóides (Innes, 2012).

## **2) Corticosteróides**

As fortes propriedades anti-inflamatórias dos corticosteróides permitem aliviar significativamente a sintomatologia, existindo algumas evidências de que exercem uma ação protetora sobre a cartilagem articular de cães com DDA (Innes, 2012). O administração local por via de infiltração articular é a principal forma de tratamento com corticoesteroides na DDA. O tratamento sistémico também pode no entanto ser uma opção quando mais do que uma articulação está afectada, devendo ser utilizadas doses baixas (Innes, 1995). Por atuarem um nível acima na cadeia de metabolização do AA em relação aos AINEs, a utilização destes em concomitância com corticoesteroides é redundante além de poder aumentar o risco de toxicidade (Fox & Millis, 2010d).

Figura 13- Esquematização simplificada da cascata do ácido araquidônico.



### 3) Adjuvantes Analgésicos

Alguns exemplos de outros fármacos utilizados na analgesia são os opióides, a Gabapentina e a Amantadina

Os opióides são eficazes no tratamento de dor moderada a severa como as decorrentes durante agudizações da DDA. Estes fármacos podem apresentar efeitos secundários significativos que são no entanto reduzidos quando os animais se encontram com dor, não sendo normalmente impeditivos da sua utilização em doses terapêuticas (Hammond et al, 2008). Exercem a sua função através da ligação a receptores opióides específicos de três tipos: mu ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ) e delta ( $\delta$ ). Cada opióide possui o seu padrão específico de afinidades para os diversos tipos de receptores (Hammond et al, 2008). Todos os receptores são em diferentes graus potenciais promotores de analgesia, sendo os receptores  $\mu$  e  $\kappa$  do SNC aqueles responsáveis pelo maior efeito e por reações adversas como a depressão respiratória, a hipotensão e a bradicardia (Hammond et al, 2008).

A Gabapentina é um análogo do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) originalmente desenvolvido para o tratamento da epilepsia devido às suas propriedades neuroinibitórias, sendo muito utilizado atualmente no combate à dor neuropática associada a processos crónicos (Innes, 2012). As suas propriedades farmacológicas foram atribuídas inicialmente à sua analogia com o GABA, mas atualmente é reconhecido que a capacidade para bloquearem canais de cálcio ativados pela voltagem é responsável pela maior parte da analgesia (Johnston et al, 2008).

A Amantadina é um antagonista dos receptores N-metil-d-aspartato (NMDA), localizados no corno dorsal da medula espinal (Johnston et al, 2008), onde participam nas alterações sensoriais associadas à dor inflamatória prolongada (Innes, 2012).

Tabela 6- Classes de fármacos e eficácia no bloqueio das etapas fisiológicas da percepção de dor.			
Transdução (Nociceptores)	Transmissão (Nervos sensitivos)	Modulação (Espinal medula)	Percepção (Córtex cerebral)
Anestésicos locais	Anestésicos Locais	Anestésicos Locais	Anestésicos
Opióides	Agonistas $\alpha 2$	Antagonistas NMDA	Opióides
AINEs		Opióides	Benzodiazepinas
Corticosteróides		AINEs	AINEs
Adaptado de Fox, 2010			

#### 4.3.2- Agentes Moduladores das Alterações Estruturais

Os condroprotetores são um grupo de substâncias que deve idealmente ser capaz de estimular a síntese de macromoléculas pelos condrócitos, AH pelas células sinoviais, inibir os factores inflamatórios da DDA e também remover ou prevenir a formação de fibrina e trombos na vascularização sinovial e subcondral. Não existe no entanto nenhum agente que sozinho seja capaz de desempenhar todas estas funções (Piermattei et al, 2006). Uma interpretação racional do seu mecanismo de ação é a de que a provisão em excesso de percursos cartilagíneos pode favorecer a síntese de moléculas da matriz e a reparação da cartilagem (Fox & Millis, 2010d). Da classe dos condroprotetores fazem parte: 1) Ácido Hialurónico; 2) GAGs polisulfatados; 3) Polisulfato de Pentosano;

1) Ácido Hialurónico - Os produtos para a administração oral de AH fornecem não só os constituintes necessários à síntese de AH como também de GAGs (Piermattei et al, 2006). As evidências científicas resultantes dos estudos que visavam comprovar as propriedades terapêuticas do tratamento sistémico com AH não dão no entanto muitas garantias quanto à sua eficácia (Johnston et al, 2008).

2) GAGs Polisulfatados - São heparinóides sintéticos que mesmo quando veiculados por via sistémica apresentam afinidade para os PGs e proteínas não colagénicas da cartilagem (Hanson & Maddison, 2008). Promovem a inibição de MMPs, das proteases de serina, da PGE e de ON (Fox & Millis, 2010d). Além disso também diminuem a apoptose celular, a digestão dos constituintes da ME e estimulam a replicação dos condrócitos. Um estudo em cães com DDA revelou que estes GAGs também inibem a degradação da proteína oligomérica da matriz (Innes, 2012). Os seus efeitos terapêuticos também incluem a



estimulação da síntese de GAGs pelos condrócitos e de AH pelas células sinoviais (Fox & Millis, 2010d).

3) Polissulfato de Pentosano – Também é um GAG semissintético de estrutura semelhante à heparina e com propriedades antitrombóticas e lipídicas capaz aumentar a circulação sanguínea do osso subcondral (Hanson & Maddison, 2008; Johnston et al, 2008). Estudos laboratoriais demonstraram que também é capaz de retardar a degradação cartilaginosa e estimular a síntese de PG pelos condrócitos e de AH pelas células sinoviais (Innes, 2012).

#### **4.4- Terapia Cirúrgica da DDA**

Na maioria dos casos a DDA é abordada com recurso a uma combinação de fármacos e outras medidas conservativas, no entanto a gravidade de algumas alterações funcionais podem tornar os doentes candidatos a intervenção cirúrgica (Innes, 2012).

A artroplastia diz respeito aos meios cirúrgicos utilizados na reconstrução de uma articulação (Piermattei et al, 2006). Muitas das vezes o procedimento envolve a correção da causa que despoletou a DDA, a remoção de osteófitos, processo anconeal livre, processo coronoide fracturado, correção de luxações ou da instabilidade articular resultante da ruptura de ligamentos (Fox & Millis, 2010d). A remoção de osteófitos pode diminuir a compressão da cápsula articular resultando na diminuição da dor. O desbridamento articular é muitas vezes realizado no mesmo plano cirúrgico que outras técnicas como o alisamento da superfície articular, no sentido de aumentar a congruência entre as superfícies e promover uma melhor estabilidade e lubrificação articular (Piermattei et al, 2006), ou até mesmo estimular os processos de reparação com formação de fibrocartilagem (Innes et al, 2012).

Muitas vezes o tratamento ideal da DDA pode passar pela substituição integral da articulação por uma prótese (Innes et al, 2012).

A osteotomia pode ser aplicada em diferentes casos como na displasia de anca e também na luxação congénita da cabeça do rádio, em malformações e problemas nos dígitos (Piermattei et al, 2006).

#### **4.5- Terapêutica Local Infiltrativa**

A administração intra-articular de fármacos permite a aplicação do composto diretamente sobre os tecidos afetados, minimizando o envolvimento sistémico da sua ação farmacológica. Esta característica pode ser útil na DDA, onde as alterações patológicas se expressam localmente (Edwards, 2011), implicando a realização de uma artrocentese por forma a aceder ao espaço articular (Crow, 2009).

Apesar da administração ser feita no interior da cápsula articular, a membrana sinovial não é impermeável à difusão de moléculas podendo ocorrer a perda de diversos tipos de fármacos para a corrente sanguínea. Para alguns medicamentos, a via intra-articular pode ser

comparada às vias parenterais não endovenosas no que respeita à sua absorção e distribuição, motivo pelo qual muitos fármacos não são susceptíveis de serem administrados desta forma (Edwards, 2011). A diversidade de fármacos disponíveis para o combate local da dor e manutenção de função articular ainda é limitada (Qvistgaard et al, 2006), podendo alguns ter um efeito simplesmente analgésico, enquanto outros promovem efeitos moduladores das alterações estruturais (Edwards, 2011; Hammond et al, 2008).

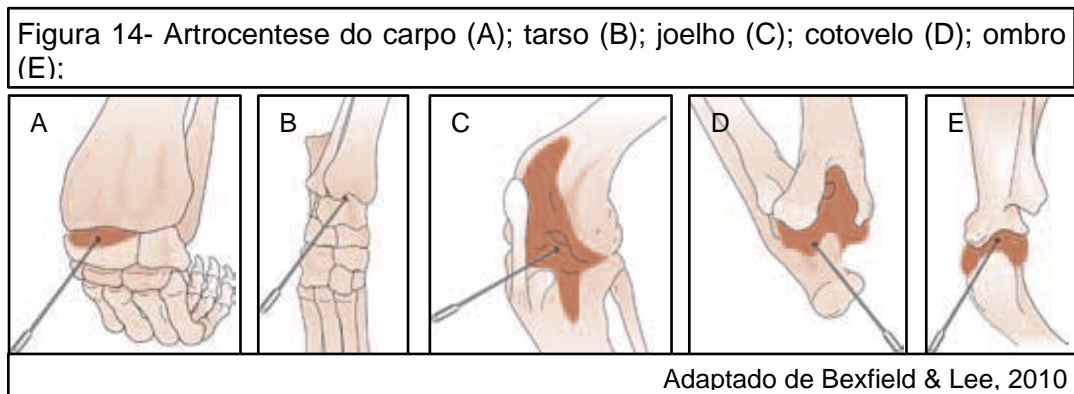
#### **4.5.1- Técnica de Artrocentese**

A artrocentese consiste na colocação percutânea de uma agulha até ao interior da cavidade articular. As indicações para a sua realização vão além da administração de agentes terapêuticos, estendendo-se também à caracterização etiológica de atries através de análise do líquido sinovial, e avaliação das alterações articulares por infiltração de contrastes radiográficos (Morgan, 2008). Apesar de não ser um procedimento cirúrgico, a sua realização implica uma assepsia rigorosa (Innes, 2012; Fox & Millis, 2010d).

O doente deve ser sujeito a tricotomia de uma área não inferior a 5cm<sup>2</sup> com o centro no local a puncionar, seguida de limpeza cutânea com solução antisséptica. Alguns pacientes podem necessitar de uma sedação ligeira para tolerarem o procedimento (Bexfield & Lee, 2010), podendo também ser realizada a infiltração subcutânea de anestésico (Crow, Walshaw & Boyle, 2009).

O procedimento varia entre diferentes tipos de articulações. O paciente deve ser colocado em decúbito contra-lateral ao lado da articulação a puncionar (Bexfield & Lee, 2010), podendo ser adoptado o decúbito esternal quando a intervenção se destina ao carpo (Morgan, 2008). No caso do carpo, o seu espaço articular é mais facilmente acessível durante a sua flexão completa, sendo palpado como uma depressão que se inicia distalmente ao rádio. A agulha deve ser inserida medialmente ao tendão extensor comum dos dedos e à veia cefálica, que passam sobre o centro da cavidade articular e lateralmente ao tendão do músculo extensor carpo-radial (Bexfield & Lee, 2010). No tarso, deve ser realizada a mobilização com extensão e flexão da articulação tibiotársica de modo a permitir a identificação dos seus limites. Com o membro em posição neutra, a agulha deve ser inserida dorso-lateralmente à articulação e medialmente ao maléolo lateral da fíbula, progredindo planto-lateralmente até ao espaço articular (Bexfield & Lee, 2010). Para a artrocentese do joelho a articulação é flectida parcialmente sendo possível sentir a cavidade articular aplicando pressão digital lateralmente ao tendão patelar. A punção deve ser feita nesta região no sentido medial da articulação, podendo a ponta da agulha ficar no interior da almofada adiposa infrapatelar, sendo necessário acoplar uma seringa para exercer uma pressão de refluxo avançando e recuando em profundidade com a agulha até garantir o seu posicionamento correto no espaço articular (Bexfield & Lee, 2010). Para o cotovelo a

articulação deve ser flectida a 45°, localizando-se o local de punção entre o côndilo lateral do úmero e o olecrâneo. A agulha deve ser introduzida a meia distância destas duas referências, e paralelamente ao eixo da ulna (Bexfield & Lee, 2010). Por último, o ombro é puncionado em posição neutra, sendo o primeiro passo a identificação do processo acrómio. A Agulha deve ser introduzida diretamente abaixo do acrómio com direção perpendicular à pele. A distração da articulação pode facilitar a punção através do aumento da janela para o espaço articular. No caso de se atingir osso, a agulha deve ser retrocedida gentilmente e ligeiramente redirecionada até a articulação ser penetrada (Bexfield & Lee, 2010). Após o alcance do espaço articular, deve ser feita a acoplagem de uma seringa vazia à agulha para aspiração de líquido sinovial, ou de uma seringa contendo o fármaco a infiltrar (Bexfield & Lee, 2010).



Falhas de assepsia e má preparação da pele podem resultar na inoculação de bactérias na cavidade articular e no desenvolvimento de artrites sépticas iatrogénicas. As punções repetidas e a abrasão da superfície articular por técnica não perfeita podem resultar no desenvolvimento de hemartrose além do agravamento das lesões cartilagueas (Morgan, 2008). O conhecimento anatómico da região em foco é por isso primordial por forma a evitar lesões articulares ou de vasos e nervos periarticulares (Center, 2012; Morgan, 2008).

#### 4.5.2- Fármacos de Administração Intra-Articular

Algumas substâncias que integram nutracêuticos para controlo da DDA também são utilizadas em formulações para administração por via intra-articular, como é o caso do AH (Qvistgaard et al, 2006). A infiltração articular com AH melhora a função do líquido sinovial através do aumento da sua viscosidade, neutralização de radicais livres e redução da inflamação articular (Qvistgaard et al, 2006). Na presença de efusão articular as infiltrações com AH podem não ser eficazes, enquanto na ausência de efusão a sua ação já foi comparada à dos glucocorticóides no alívio da sintomatologia em humanos (Qvistgaard et al, 2006). Também o polisulfato de pentosano pode ser formulado para ser infiltrado diretamente

na cavidade articular. Demonstra propriedades anti-catabólicas inibindo diretamente enzimas e alterando a expressão de MMPs (Uthman *et al.*, 2003).

Ao longo da última década houve um interesse crescente na utilização das células mesenquimatosas de modo a promover a regeneração do tecido conjuntivo. Atualmente existem técnicas para o tratamento de DDA canina que envolvem a colheita de tecido adiposo autólogo com extração das células do seu estroma, o qual contém uma proporção de células mesenquimatosas multipotentes (Innes, 2012). Estas células são depois integradas numa suspensão formulada para administração intra-articular (Wood *et al.*, 2012). Os mecanismos de ação propostos baseiam-se no facto das células mesenquimatosas produzirem um antagonista da IL-1, que é um dos principais intervenientes na bioquímica da DDA, e o aumento da concentração local de citocinas e de fatores de crescimento (Fox & Millis, 2010d).

As terminações nervosas também são dotadas de receptores opióides, o que justifica o facto de infiltrações intra-articulares de morfina promoverem a analgesia em cães com inflamação articular (Hammond *et al.*, 2008).

A administração de corticoides pode ser feita por diversas vias mas via intra-articular promove a supressão da inflamação local de forma rápida e pronunciada com diminuição da dor, apesar da duração deste efeito ser limitada. A sua utilização é eficaz mesmo na presença de efusões articulares (Qvistgaard *et al.*, 2006).

Diminuem diretamente a expressão das MMPs, e indiretamente por reduzirem a expressão de citocinas inflamatórias e de mediadores eicosanóides (Hulse, 1998). A sua ação é mediada pelos receptores nucleares glucocorticóides, que influenciam diretamente a síntese de mRNA e proteínas (Creamer, 1997). O recurso a esta terapêutica pode ser equacionado quando há diminuição da qualidade de vida do doente e as outras abordagens terapêuticas são insuficientes na promoção do seu conforto, quando existe preocupação acerca dos efeitos secundários dos AINEs, ou em caso de agudizações da doença (Innes, 2012).

Apesar dos efeitos sistémicos destas infiltrações articulares serem reduzidos, a longo prazo é possível a ocorrência de efeitos adversos a nível articular associada à redução da síntese de colagénio e PGs, obrigando a prudência na sua utilização (Innes, 2012). Esta dualidade pode estar relacionada com a concentração de fármaco no interior da articulação, onde níveis baixos podem inibir a produção de enzimas líticas e quantidades mais elevadas prejudicam a capacidade sintética das células (Innes, 1995). A cortisona e a hidrocortisona abandonam a cavidade articular rapidamente, da mesma forma que os corticosteroides administrados por via intra-muscular conseguem penetrar articulações distantes (Gray, Tenenbaum & Gottlieb, 1981). A administração intra-articular destes esteroides tem por isso o potencial para deprimir o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Gray *et al.*, 1981).

#### **4.5.3- Outros Fármacos para Terapias Infiltrativas**

As lavagens articulares com soluções fisiológicas também podem ser realizadas como forma de tratamento (Uthman *et al.*, 2003). Outros fármacos podem ser utilizados por esta via, como por exemplo: A Bupivacaína que promove o alívio da dor articular até 24 horas (Uthman *et al.*, 2003); A Somatostatina que promove a diminuição da dor e o aumento da mobilidade articular (Uthman *et al.*, 2003); a Dextrose a 10% (Uthman *et al.*, 2003); os AINEs como Fenilbutazona e o Tenoxicam (Uthman *et al.*, 2003); e o Estanozolol;

O Estanozolol é um esteroide androgénico-anabolizante dotado de propriedades anabólicas, androgénicas e anti-catabólicas (Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001; Helfman & Falanga, 1995). O efeito das infiltrações articulares com este medicamento foi avaliado em 2013 num estudo em ovinos com DDA induzida no joelho. Apesar da longa duração do protocolo e da elevada frequência de infiltrações que o estudo implicou, não houve o desenvolvimento de nenhuma reação sinovial ao medicamento, nem de alterações comportamentais ou de peso corporal atribuíveis ao Estanozolol. Comparativamente com os animais que não receberam tratamento, os infiltrados com Estanozolol manifestaram menos claudicação no decorrer do estudo, menos erosão comprovada histologicamente, menos desenvolvimento de fibrose capsular, de osteófitos e de esclerose subcondral, expressando em vez disso sinais de regeneração e uma arquitetura cartilágnea normal. Os autores do estudo consideraram que estes resultados encorajadores permitiriam avançar com ensaios clínicos noutras espécies de interesse, nomeadamente cavalos e cães que tenham desenvolvido DDA de forma natural (Spadari *et al.*, 2013). Outro trabalho realizado em 2014 pretendeu avaliar a eficácia clínica do estanozolol no tratamento da DDA em cotovelos de cães domésticos que desenvolveram a condição de DDA secundariamente a uma causa natural. O grupo que recebeu a infiltração intra-articular com Estanozolol apresentou mais melhorias clínicas nos primeiros dias após o tratamento, tendo 80% dos casos demonstrado menos claudicação. A morfologia articular radiográfica destes doentes também se manteve mais estável nos 60 dias do protocolo, comparativamente com os cães que não receberam infiltração (Carli, 2014).

## **5- O Estanozolol**

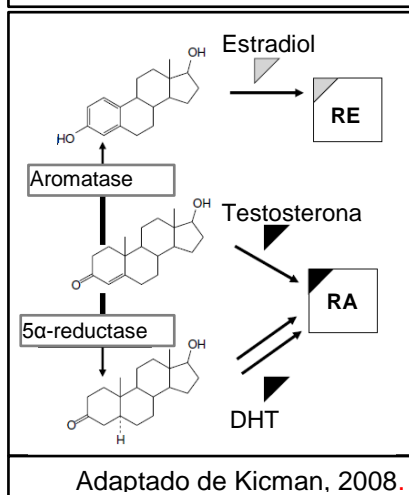
Sintetizado pela primeira vez em 1959 a partir da testosterona, o Estanozolol tem vindo a ser utilizado na Medicina Veterinária em contextos semelhantes ao de outros esteroides anabólico-anabolizantes, nomeadamente no tratamento sistémico de anemia associada a doenças crónicas, estimulação do apetite, aumento de peso, de força e de vitalidade (Plumb, 2008).

A testosterona é o principal esteróide androgénio produzido pelo organismo, maioritariamente a nível das células de Leydig testiculares e em menor proporção a nível

das glândulas adrenais e ovários de fêmeas (Kicman, 2008), sendo os seus precursores imediatos a androestenediona e em menor proporção o androstenediol, que derivam do colesterol (Mottram & George, 2000). Desempenha funções androgénicas e anabólicas fisiológicas em vários tecidos, nomeadamente a nível do sistema reprodutor, músculo-esquelético, tecido hematopoiético, fígado, rins, e SNC (Mottram & George, 2000). A sua ação androgénica permite a correta diferenciação do aparelho reprodutor masculino, e também que a espermatogénese ocorra de forma normal no interior dos túbulos seminíferos. No que respeita às suas propriedades anabólicas, a testosterona promove o aumento da síntese proteica e o desenvolvimento dos ossos longos e da massa muscular associados ao crescimento (Helfman & Falanga, 1995).

Os esteroides androgénios são moléculas relativamente pequenas capazes de se difundir passivamente para dentro das células (Kicman, 2008), desencadeando as suas ações após a ligação a receptores nucleares de androgénios que alteram a expressão génica e modulam a transcrição proteica (Yuan & Forman, 2005). A porção do receptor que se liga ao

Figura 15- Esquematização da conversão enzimática da Testosterona, e afinidade dos respectivos derivados



ADN tem especificidade para determinadas sequências genéticas cuja expressão é alterada pelo complexo ligando-receptor (Kicman, 2008). O mesmo receptor é responsável por mediar as funções anabólicas e as androgénicas (Helfman & Falanga, 1995).

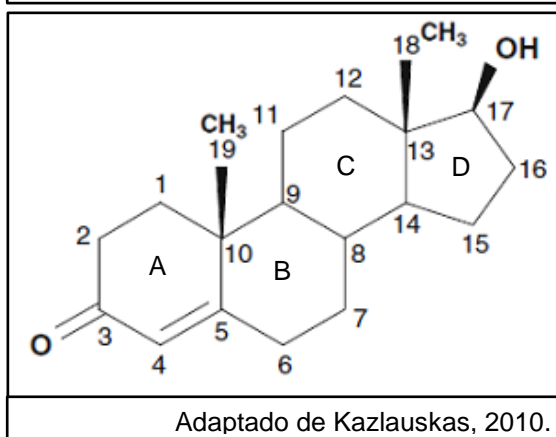
O efeito dos androgénios sofre modelação nas células alvo por parte de enzimas presentes nos tecidos. A nível do sistema reprodutor a enzima 5α-reductase converte a testosterona em 5α-dihidrotestosterona (DHT), uma molécula mais potente e que se liga com maior afinidade aos receptores androgénios (RA). Os androgénios também podem acabar por se ligar a receptores estrogénicos (RE) após conversão em estradiol pela enzima aromatase (Kicman, 2008), o que provavelmente só ocorre após a

saturação dos RA (Hartgens & Kuipers, 2004).

Os benefícios das propriedades anabólicas da testosterona no combate a várias condições catabólicas criaram o interesse no desenvolvimento de fármacos capazes de desempenhar estas funções de forma mais seletiva e com menos efeitos androgénicos (Shahidi, 2001). A Testosterona começou por isso a ser submetida a modificações estruturais no sentido de aumentar o seu potencial anabólico em detrimento do androgénico, dando origem aos esteróides anabólico-androgénicos (EAAs) (Kicman, 2008). No entanto, a partilha do mesmo receptor por ambas as funções torna impossível a existência de um esteróide apenas anabolizante e sem nenhuma propriedade androgénica (Helfman & Falanga, 1995).

Outras das características que se pretendem aperfeiçoar nos EAAs são o aumento do seu tempo de semi-vida, alteração do seu padrão metabólico e diminuição da sua conversão para estradiol (Evans, 2004). Em humanos as formulações de EAAs podem ser administradas por via oral, injetável ou por via tópica transdérmica mediante um *patch* ou gel (Evans, 2004). A testosterona é metabolizada principalmente a nível hepático pelo complexo enzimático do citocromo p450. As preparações terapêuticas dos seus derivados foram optimizadas no sentido de impedir o seu metabolismo imediato (Basaria, Wahlstrom & Dobs, 2001), sendo alguns sintetizados na forma de esteres injetáveis. Neste caso o anel D da testosterona sofre a esterificação do seu carbono 17, formando-se um grupo 17 $\beta$ -hidroxilo que caracteriza esta classe de anabolizantes (Pope & Kanayama, 2012). A absorção destas

Figura 15- Estrutura da Testosterona.

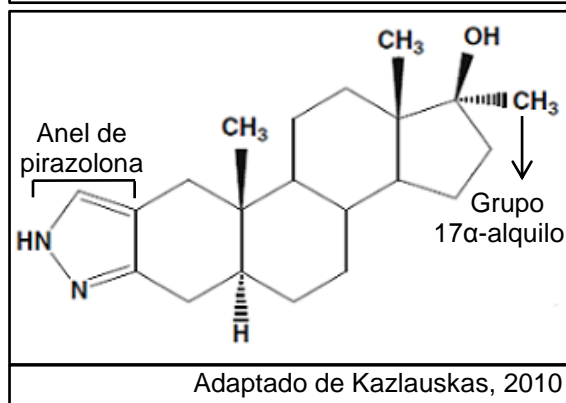


formulações após administração parenteral é lenta (Evans, 2004), ocorrendo com a hidrólise gradual do composto permitindo a manutenção de um nível estável que pode perdurar desde alguns dias até semanas (Pope & Kanayama, 2012). No entanto quando administradas por via oral sofrem um grande efeito de primeira passagem antes da entrada em circulação. A metilação do carbono 17 origina os esteroides anabolizantes 17 $\alpha$ -alquilo, que apresentam uma

metabolização hepática mais lenta (Helfman & Falanga, 1995). Apesar de resistirem bem ao efeito de primeira passagem, também acabam por ser excretados por via urinária ou fecal em natureza, ou após metabolização ou conjugação (Basaria *et al.*, 2001). A concentração dos EAAs de ação oral abandona a janela terapêutica rapidamente, estando a sua utilização normalmente associada à toma diária do medicamento (Pope & Kanayama, 2012).

Comparativamente a outros EAAs utilizados no contexto da Medicina Veterinária, o Estanozolol além de apresentar um menor potencial androgénico (Plumb, 2008) desempenha outras ações ainda não identificadas nos demais. O seu índice anabólico/androgénico é um dos maiores do grupo, estimado entre 30:1 e 100:1 (Helfman & Falanga, 1995). Contrariamente a outros esteroides com maior potencial androgénico, o tratamento prolongado e com doses elevadas de Estanozolol não provocou alterações significativas nos padrões de atividade e agressividade em ratinhos (Martinez-Sanchis *et al.* 1996). Não é produzido na forma

Figura 16- Estrutura do Estanozolol.



esterificada apresentando sempre o grupo 17 $\alpha$ -alquilo, possuindo também um anel de pirazolona fundido nos carbonos 2 e 3 do seu núcleo esteróide que potencia as suas propriedades anabólicas. Comparativamente com a testosterona também não apresenta uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5. As suas especialidades farmacêuticas injetáveis vêm na forma de suspensão aquosa (Kazlauskas, 2010). O tempo de semi-vida do Estanozolol em cavalos é inferior ao de outros esteróides anabolizantes como a boldenona, e a sua absorção por via intramuscular é mais rápida (Soma *et al.*, 2007).

Além do Estanozolol atuar a nível dos RA como os seus homólogos, alguns dos seus efeitos resultam de ações a nível de outros receptores como os RE, receptores glucocorticoides e receptores de progesterona com os quais a testosterona não interage (Rinnovati, Romagnoli & Spadari, 2015). O anabolismo do Estanozolol é potenciado pelo efeito anti-catabólico que exerce a nível dos receptores glucocorticóides, comportando-se como um antagonista competitivo dos corticosteroides catabólicos (Kicman, 2008; Hartgens & Kuipers, 2004). Num estudo *in vitro* esta formulação do Estanozolol mostrou ser capaz de interagir com um tipo de receptor presente no fígado de ratos conhecido por fazer ligação com glucocorticóides, progesterona e estrogénios. Além de competir com alguns dos seus ligandos, o Estanozolol provocou a diminuição da concentração desses mesmos receptores (Fernández *et al.*, 1994).

A nível do SNC, este EAA é capaz de alterar o funcionamento dos receptores do GABA, fazendo a sua estabilização e diminuindo a sua afinidade para a ligação com benzodiazepinas (Masonis & McCarthy, 1996). Também modula a ação dos receptores opióides, de dopamina e de serotonina, pensando-se que estes mecanismos sejam responsáveis por algumas alterações comportamentais em humanos (Pope & Kanayama, 2012).

Os EAAs 17 $\alpha$ -alquilados estão associados à expressão de determinadas proteínas plasmáticas de origem hepática (Fernández *et al.*, 1994). A administração destas formas de Estanozolol por via oral apresenta potentes propriedades fibrinolíticas, sendo capaz de diminuir a concentração de ativador tecidual de plasminogénio. Acredita-se que esta função seja mediada pela sua interferência na síntese de proteínas hepáticas envolvidas na fibrinólise (Helfman & Falanga, 1995).

Em condições normais os factores de crescimento de fibroblastos estimulam a síntese de ADN por parte de fibroblastos da pele e tecido sinovial de humanos. O Estanozolol é capaz de inibir este efeito em ambos os tipos de células, indicando que os dois são responsivos à sua presença. Também é responsável por estimular a síntese de PGE<sub>2</sub>, collagenases e estromelisinases a nível dos fibroblastos de pele humana, mas não nos sinoviais. Estas funções são por isso mediadas por outro receptor que não se encontra presente no tecido sinovial (Ellis, Cawston & Mackie, 1993).



Em condrócitos cultivados *in vitro* o Estanozolol estimula a síntese de factores tróficos como o IGF-1, e diminui a apoptose celular através da diminuição da produção de ON (Spadari *et al.*, 2013). A nível destas células também é capaz de aumentar a concentração de receptores ER e IGF-1R (Zhu *et al.*, 2009). A estimulação do eixo da hormona do crescimento (GH) - IGF-1 também é um dos mecanismos sugeridos para explicar o seu anabolismo (Evans, 2004).

A testosterona é conhecida por diminuir a produção de colagénio pelos fibroblastos, enquanto o Estanozolol é capaz de aumentar a síntese de TGF-1 $\beta$  pelos fibroblastos de pele humana até 200%, o que se traduz num aumento da síntese de colagénio que pode alcançar os 35% (Falanga *et al.*, 1998). Em humanos, o aumento de TGF-1 $\beta$  está associado a uma diminuição da dor articular (Rinnovati *et al.*, 2015).

Estudos *in vitro* revelam que é capaz de aumentar a concentração de sulfato de condroitina em tecidos lesionados, conferindo assim uma maior resistência às zonas em cicatrização (Watts *et al.*, 1965).

Na presença de proteínas e calorias suficientes o Estanozolol, à semelhança de outros EAAs, já demonstrou ser capaz de promover o crescimento de tecidos (Plumb, 2008b). Também estimula a síntese de factores eritropoiéticos aumentando a produção de células sanguíneas (Plumb, 2008b), e a afinidade dos eritrócitos para o oxigénio (Shahidi, 2001). Estas propriedades anti-anémicas e anabólicas tornam o Estanozolol num bom aliado para o tratamento sistémico de estados de caquexia e anemia associadas a doenças crónicas (Kicman, 2008). A sua utilização também já foi feita em humanos afectados por miopatias com atrofia e esgotamento muscular relacionadas com o VIH (Falanga *et al.*, 1998). Quando Administrados no período perioperatório os esteroides anabolizantes contrariam os efeitos deletérios dos corticosteroides a nível da cicatrização e reparação óssea (Falanga *et al.*, 1998). A sua estimulação à síntese de sulfato de condroitina em tecidos lesionados também poderá ter uma influência positiva sobre a regeneração tecidular (Watts *et al.*, 1965).

As propriedades fibrinolíticas do Estanozolol já foram utilizadas em humanos no tratamento de artrite reumatóide, onde a patogenia se deve em parte à deposição de fibrina e diminuição da fibrinólise (Belch *et al.*, 1986; Ellis *et al.*, 1993), e também de aterosclerose. Também já foi utilizado na espécie humana no tratamento de urticária, lipodermatosclerose e fenómeno de *Raynaud* (Belch *et al.*, 1986; Ellis *et al.*, 1993).

Em cães o Estanozolol já foi aplicado com sucesso no tratamento do colapso traqueal, uma condição associada ao desenvolvimento de condromalácia nos anéis de cartilagem hialina da traqueia, com diminuição da concentração de sulfato de condroitina e colagénio e sua substituição por fibrocartilagem ou tecido fibroso (Adamma-Moraitou *et al.*, 2009). Cerca de 93% por cento dos cães que fizeram o tratamento demonstraram melhorias duradouras na sua condição, tendo mesmo 57% alcançado a cura aparente quando avaliados

endoscopicamente (Adamma-Moraitou *et al.*, 2009). Os autores atribuíram os benefícios do estanozolol no tratamento desta condição à sua capacidade para aumentar a concentração de TGF-1 $\beta$ , juntamente com as já conhecidas ações sobre a síntese de colagénio e IGF-1 deste esteróide anabolizante (Adamma-Moraitou *et al.*, 2009).

As contraindicações de um tratamento sistémico com estanozolol em cães são as mesmas de outros EAAs (Plumb, 2008). A sua utilização não é aconselhada em fêmeas gestantes nem em machos reprodutores podendo ocorrer a masculinização dos fetos bem como alterações na espermatogénese (Plumb, 2008b).

A ação anabólica dos EAAs tem um efeito hipoglicemiante potencialmente sério em doentes diabéticos medicados com insulina, podendo haver necessidade de reajustar as doses desta hormona (Plumb, 2008b).

Estas drogas têm potencial para provocar a retenção de azoto, sódio, potássio e fósforo, e de diminuir a excreção urinária de cálcio e provocar hipercolesterolemia (Ellis, Cawston & Mackie, 1993). Em humanos encontram-se por isso contraindicados em doentes com disfunções hepáticas, nefrites, hipercalemia, carcinoma prostático ou hipertrofia benigna da próstata, ou com história de enfarte miocárdico (Plumb, 2008b). O tratamento prolongado e em sobredose na espécie humana está associado à perturbação do equilíbrio eletrolítico, hepatotoxicidade, alterações comportamentais, hipertensão arterial, cardiomiopatias, alterações do metabolismo lipídico, da hemostase, da agregação plaquetária e anomalias do sistema reprodutor (Adamma-Moraitou *et al.*, 2009). O fabricante recomenda que o tratamento sistémico de cães com disfunção cardíaca ou renal seja feito cautelosamente e concomitantemente com fluidoterapia e a monitorização eletrolítica (Plumb, 2008).

O fornecimento exógeno de moléculas com propriedades androgénicas pode levar à inibição da síntese de hormona luteinizante (LH) e ao mecanismo de retroalimentação negativa sobre hormona estimulante folicular (FSH), necessários à síntese do principal estrogénio do organismo, a testosterona, podendo levar à inibição da espermatogénese, atrofia muscular e esterilidade (Plumb, 2008b).

### III- Trabalho Experimental

#### 1- Materiais e Métodos

##### 1.1- Justificação do Trabalho Experimental

As fortes propriedades anti-inflamatórias e analgésicas dos AINEs tornam-nos na opção mais comum no tratamento da DDA canina (Fox & Millis, 2010c). No entanto, o desenvolvimento de efeitos adversos em vários sistemas orgânicos torna-se uma realidade, considerando que na maioria dos casos os tratamentos são repetidos e prolongados (Innes, 2012). De acordo com o previamente descrito, a longo prazo a administração de fármacos do tipo corticosteroide por via intra-articular ou outra, também está associada a efeitos secundários adversos (Hulse, 1998). Apesar da modulação da sintomatologia proporcionada em diferentes graus por AINEs, corticosteroides e opióides, estes fármacos não são capazes de travar as alterações da estrutura articular (Fox & Millis, 2010c). Procuram-se actualmente novas moléculas com propriedades anabólicas e anti-catabólicas na cartilagem atuando assim na problemática da DDA. O Estanozolol é uma dessas moléculas que muito embora não seja recente, apenas ultimamente tem sido estudada no contexto da DDA, tendo já sido demonstrando em alguns estudos *in vitro* (Kicman, 2008; Hartgens & Kuipers, 2004) e *in vivo* com ovinos (Spadari *et al.*, 2013), equinos (Rinnovati *et al.*, 2015) e canídeos (Carli, 2014), que se trata de uma molécula promissora no alívio sintomático da condição e com propriedades regeneradoras das articulações (Spadari *et al.*, 2013).

O presente trabalho realizado no âmbito do estágio curricular no CMVAA foi motivado pela revisão das potencialidades terapêuticas deste fármaco, e pela convicção de que mais há a ser feito no que respeita às modalidades atualmente estabelecidas para o tratamento da DDA canina.

##### 1.2- Objectivos

Os principais objectivos do ensaio clínico foram:

- Estudar a eficácia clínica das infiltrações intra-articulares com Estanozolol no tratamento de joelhos de canídeos com DDA;
- Quantificar os níveis de IL-1 $\beta$  sérica de canídeos com DDA e de canídeos saudáveis;
- Medir as diferenças na concentração de IL-1 $\beta$  sérica entre cães saudáveis e cães com DDA;
- Avaliar as diferenças na concentração de IL-1 $\beta$  sérica de cães com DDA antes e após o tratamento;
- Estudar a relação entre as variáveis avaliadas;

### 1.3- Amostra

A amostra foi composta dois grupos de indivíduos da espécie *Canis familiaris*, divididos num em dois grupos: Grupo de canídeos com DDA (GDDA) composto por indivíduos com degenerescência articular no joelho; Grupo saudável (GS) composto apenas por indivíduos saudáveis;

Alguns dos canídeos de GDDA apresentavam na sua história clínica o recurso a AINEs e opióides para o controlo de sintomatologia aguda. Os indivíduos apenas foram incluídos no estudo após a autorização dos seus proprietários, que foram previamente informados acerca dos seus objectivos, fundamentos do tratamento, efeitos clínicos esperados e possíveis complicações. Para tal, foi realizada a assinatura de um consentimento informado. Os critérios de inclusão dos doentes em GDDA foram os seguintes:

- Diagnóstico de DDA no joelho confirmada com recurso a radiografias digitais nos planos laterolateral e crânio-caudal;
- Terapêutica de base comum para o controlo da DDA contemplando: Nutracêuticos, Condroprotetores e Gabapentina;
- Possibilidade de acompanhamento ao longo de vários pontos temporais estabelecidos previamente ao protocolo;
- Estar à responsabilidade de proprietários capazes de fornecer informação quanto à evolução dos seus animais;

O GS foi composto por 13 indivíduos saudáveis (n=13), sem alterações no exame de estado geral, sem história de doença recente ou doença crónica, e com exames laboratoriais básicos que compreenderam o hemograma e bioquímicas funcionais normais.

### 1.4- Desenho Experimental

Foram considerados 4 pontos temporais distintos no desenvolvimento do estudo: T0 (no início do protocolo e dia da infiltração), T1 (4º dia após administração do Estanozolol), T2 (8º dia após administração do Estanozolol) e T3 (23º dia após administração do Estanozolol). A envolvimento dos canídeos de GS resumiu-se à colheita de sangue realizada numa única ocasião (T0) para quantificação da IL-1 $\beta$  sérica.

As tarefas associadas ao GDDA em cada um dos pontos encontram-se descritas em seguida:

Tabela 7- Distribuição de atividades pelos diferentes pontos temporais (GDDA).	
T0 (Dia 0)	
<p>Preenchimento do questionário referente à avaliação da opinião dos proprietários;</p> <p>Avaliação de parâmetros Clínicos;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Classificação do grau de claudicação;</li> <li>• Mobilização articular e avaliação da presença de dor;</li> <li>• Medição das temperaturas transcutânea articular e rectal com termómetro de infra-vermelhos;</li> </ul> <p>Radiografia digital Latero-lateral e cranio-caudal do joelho;</p> <p>Preenchimento do formulário destinado à avaliação clínica do paciente em questão;</p> <p>Avaliação laboratorial</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colheita de sangue para quantificação da IL-1<math>\beta</math> sérica;</li> </ul> <p>Realização do tratamento</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiltração sinovial de solução de Estanozolol na articulação selecionada;</li> </ul>	
T1 (Dia 4)	
<p>Preenchimento do questionário referente à avaliação da opinião dos proprietários;</p> <p>Avaliação de parâmetros Clínicos;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Classificação do grau de claudicação;</li> <li>• Mobilização articular e avaliação da presença de dor;</li> <li>• Medição das temperaturas transcutânea articular e rectal com termómetro de infra-vermelhos;</li> </ul> <p>Preenchimento do formulário destinado à avaliação clínica do paciente em questão;</p>	
T2 (Dia 8)	
<p>Preenchimento do inquérito referente à avaliação da opinião dos proprietários;</p> <p>Avaliação de parâmetros Clínicos;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Classificação do grau de claudicação;</li> <li>• Mobilização articular e avaliação da presença de dor;</li> </ul> <p>Preenchimento de formulário destinado à avaliação clínica do paciente em questão;</p> <p>Avaliação laboratorial</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colheita de sangue para quantificação da IL-1<math>\beta</math> sérica;</li> </ul>	
T3 (Dia 23)	
<p>Preenchimento do inquérito referente à avaliação da opinião dos proprietários;</p> <p>Avaliação de parâmetros Clínicos;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Classificação do grau de claudicação;</li> </ul>	

- Mobilização articular e avaliação da presença de dor;
- Preenchimento do formulário destinado à avaliação clínica do paciente em questão;
- Radiografia digital Latero-lateral e cranio-caudal do joelho;

A monitorização da evolução clínica dos doentes teve por base o resultado dos questionários dos proprietários e dos formulários preenchidos pelos Médicos Veterinários do CMVAA. Os questionários dirigidos aos proprietários foram elaborados segundo o trabalho de Brown (2006), validado para avaliação da dor crónica e qualidade de vida de cães. O resultado de cada questionário foi avaliado de acordo as indicações dos criadores do formulário original no sentido de calcular a correspondência entre a opinião dos proprietários e a qualidade de vida de cada paciente, assim como o seu grau de dor e a respectiva interferência na função.

Alguns dos parâmetros presentes nesse questionário também foram incluídos no formulário utilizado para o registo da opinião dos clínicos, juntamente com outros campos destinados à categorização e registo dos seguintes parâmetros:

- 1) Grau de dor à manipulação articular;
- 2) Grau de claudicação;
- 3) Registo temperatura retal e temperatura transcutânea articular do joelho;

O questionário dos proprietários e o formulário destinado aos clínicos encontram-se apresentados em anexo (Anexo 2), juntamente com o inquérito original de Brown (2006).

Todas as articulações foram radiografadas previamente à infiltração em T0, e passados 23 dias (T3) para avaliação das suas alterações morfológicas. Em cada ocasião foi feita uma projecção crânio-caudal e outra latero-lateral com decúbito ipsilateral à articulação em foco. O conjunto de imagens foi avaliado no mesmo dia após o fim do protocolo, tendo os sinais radiográficos sido quantificados de forma semelhante ao realizado por Innes (2004) na avaliação da DDA em de joelhos de cães. Esses parâmetros foram:

- Estado global da doença (0-3);
- Efusão articular (0-2);
- Osteófitose (0-3);
- Mineralização intra-articular (0-2);
- Esclerose subcondral (0-1)

No que respeita à temperatura transcutânea articular, a sua medição foi feita com o recurso a um termómetro de tecnologia de infravermelhos (Thermofocus® - *Tecnimed*), após tricotomia da região na sequência da preparação para a artrocentese. A medição foi

realizada sempre lateralmente ao tendão patelar e no esfíncter anal sempre em duplicado de modo a obter uma média de ambas, sendo que antes das medições os pacientes permaneceram durante cerca de 15 minutos em repouso numa sala com a temperatura controlada a 20°C, numa tentativa de normalizar as condições físicas do exame.

Foram colhidas amostras de sangue periférico de cada indivíduo em estudo para posterior quantificação de IL-1 $\beta$ , considerada um dos principais agentes potenciadores do catabolismo e inflamação articular presentes na condição de DDA (Buckwalter et al, 2005). Em GS este procedimento apenas foi realizado em T0, enquanto GDDA fez colheita nos tempos T0 e T2.

As punções foram feitas nas veias cefálica ou safena com recurso a agulhas de 23G associadas a seringas de 2mL, sendo o sangue transferido para microtubos heparinizados. Estes microtubos foram depois centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos, e o soro separado para um microtubo seco e congelado a -20°C. No caso dos doentes com DDA que foram infiltrados em T0, a colheita de sangue foi realizada previamente à artrocentese.

Para o tratamento utilizou-se uma solução aquosa injetável com 50mg/mL de Estanozolol, com Fosfato dissódico, Polissorbato 80, Mertiolo de Sódio e Cloreto de Sódio como excipientes (Winstrol Depot – Zambon). Cada articulação foi submetida apenas a um único tratamento em T0, na dose de 0,3mL/kg, tendo a artrocentese sido realizada com agulha de 23G e sem a ocorrência de nenhuma complicação. Posteriormente à infiltração foi feita a mobilização passiva de cada articulação para facilitar a dispersão do fármaco pelo espaço articular. Em nenhuma das situações houve necessidade de recurso a anestesia ou sedação, tendo sido realizada previamente apenas a aplicação tópica de gel de Bupivacaína, seguida de uma infiltração subcutânea de Lidocaína com agulha de 25G na região a puncionar.

A quantificação da IL-1 $\beta$  foi realizada através do método ELISA com recurso a um sistema do fabricante Sigma-Aldrich® (referência RAB0572-1KT) validado para a medição de IL-1 $\beta$  canina em soro, plasma, sobrenadantes celulares, lisados de células e urina. A realização dos testes e medições foram realizadas no laboratório de análises clínicas da ALS ControlVet. Todas as indicações do fabricante foram cumpridas, incluindo a análise simultânea e em duplicado de todas as amostras, e a medição da absorvância a 450nm de imediato com um espectrofotómetro da marca Tecan e modelo *Spectra Classic Plate Reader*. O protocolo do método utilizado encontra-se disponível em anexo (Anexo 3).

A análise estatística dos dados foi feita com recurso ao programa SPSS® Statistics 19 da IBM®, e também o MedCalc® 15 da BVBA. Esta análise incluiu a realização de estatística descritiva; testagem da normalidade das variáveis referentes às idades dos indivíduos em estudo, bem como os seus pesos e concentrações de IL-1 $\beta$ ; avaliação da concordância entre diferentes avaliadores (entre clínicos, ou entre clínicos e proprietários), e também o cálculo da significância das diferenças entre variáveis de diferentes grupos ou diferentes pontos temporais. Foram realizados os testes de Shapiro-Wilk, teste-t para amostras emparelhadas, teste de Wilcoxon, teste de Friedman, equação de Welch, e coeficiente de correlação de Pearson. A concordância entre diferentes opiniões foi calculada pelo método de Lin e Alfa de Cronbach. Toda a análise estatística assumiu um nível de significância de 95%, e um  $p=0,05$ .

## 2- Resultados

### 2.1- Caracterização da Amostra

A amostra estudada compreendeu 20 indivíduos ( $n=20$ ) da espécie *Canis familiaris*, de ambos os géneros (65% fêmeas e 35% machos), dividida em 2 grupos:

- um grupo de indivíduos saudáveis (GS) composto por 13 cães ( $n=13$ ), e um outro grupo de indivíduos com Doença Degenerativa Articular (GDDA) composto por 7 cães ( $n=7$ ).

O GS caracterizou-se por ser constituído por 61,5% de fêmeas e 31,8% de machos, com uma média de idade de  $3,9 \pm 0,7$  anos (mínimo 1 e máximo de 9 anos); e uma média de peso vivo de  $24,3 \pm 3$ kg (mínimo de 11 e máximo de 45kg). Utilizando o teste de Shapiro-Wilk para a testagem da normalidade, foi possível verificar que a idade e o peso vivo apresentaram uma distribuição normal com os valores de  $p=0,28$  e  $p= 0,31$ , respectivamente.

O GDDA caracterizou-se por ser constituído por 71,5 % de fêmeas e 29 % de machos, com uma média de idades de  $8,7 \pm 0,7$  anos (mínimo de 6,4 e máximo de 12,1 anos); e uma média de peso vivo de  $33,3 \pm 4,9$  kg (mínimo de 20 e máximo de 52,7 kg). A DDA foi identificada no joelho esquerdo de 4 indivíduos e no joelho direito em 3. Utilizando o teste de Shapiro-Wilk para a testagem da normalidade, foi possível verificar que a idade e o peso vivo apresentaram uma distribuição normal com os valores de  $p=0,27$  e  $p= 0,61$ , respetivamente.

Tabela 8 – Descrição da amostra do grupo de cães com DDA

Paciente	Género	Idade (anos)	Peso (kg)	Joelho	Raça
1	Fêmea	6,4	52,7	Esq.	Rafeiro do Alentejo
2	Macho	12,1	30	Esq.	Retriever de Labrador



3	Fêmea	9,1	21	Esq.	Pitbull Terrier Americano
4	Fêmea	8,4	25,3	Dto.	Pitbull Terrier Americano
5	Macho	9,4	35	Dto.	Retriever de Labrador
6	Fêmea	8,2	20	Dto.	Indeterminada
7	Fêmea	7	49	Dto.	Serra da Estrela

Tabela 9- Descrição da amostra do grupo de controlo					
Controlo	Género	Idade (anos)	Peso (kg)	Raça	
1	Macho	1,2	37	Boxer	
2	Macho	1	45	Rotweiller	
3	Fêmea	2,3	30	Pitbull	
4	Macho	5,3	25,3	Indeterminada	
5	Fêmea	1,1	40	Serra da Estrela	
6	Fêmea	8	11	Indeterminada	
7	Macho	5	12	Indeterminada	
8	Fêmea	4,2	15,3	Indeterminada	
9	Fêmea	3,5	23,7	Indeterminada	
10	Fêmea	6	15,1	Indeterminada	
11	Macho	1,5	19,7	Boxer	
12	Fêmea	9	20	Indeterminada	
13	Fêmea	3,8	22	Indeterminada	

Através da equação de Welch (ou teste-t para amostras de diferentes variâncias e dimensões) foi possível verificar que as diferenças entre as médias de idade dos dois grupos em estudo foram estatisticamente significativas ( $p \text{ value} = 0,0003$ ). O mesmo cálculo foi aplicado aos pesos de ambos os grupos, tendo-se desta vez verificado que não existiram diferenças estatisticamente significativas ( $p \text{ value} = 0,15$ ).

## 2.2- Concentração da IL-1 $\beta$ sérica

Cerca de 3 indivíduos do grupo de doentes com DDA e outros 2 do grupo de indivíduos saudáveis apresentaram em todos os pontos temporais concentrações de IL-1 $\beta$  sérica abaixo do limite de detecção permitido pelo sistema ELISA utilizado ( $>10 \text{ pg/mL}$ ).

Tabela 10 – Concentração de IL-1 $\beta$ (pg/mL) no grupo de doentes com DDA.		
	[IL-1 $\beta$ ] T0	[IL-1 $\beta$ ] T2
P1	144,55	140,91
P2	59,09	36,36
P3	<10	<10
P4	<10	<10
P5	36,36	95,45
P6	<10	<10
P7	192,73	46,36

Tabela 11 – Concentração de IL-1 $\beta$ (pg/mL) no grupo de controlo.			
	[IL-1 $\beta$ ] T0		[IL-1 $\beta$ ] T0
C1	77,27	C8	28,18
C2	<10	C9	75,45
C3	98,18	C10	24,55
C4	98,18	C11	44,55
C5	<10	C12	47,47
C6	10,91	C13	50,00
C7	20,00		

As concentrações séricas de IL-1 $\beta$  quantificadas no GS (para um n=11) seguiram uma distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk ( $p = 0,33$ ), d (máximo de 98,18 pg/mL e mínimo de 10,91 pg/mL). Aplicando o mesmo teste às concentrações do GDDA (para um n=4), verificou-se que apesar da reduzida amostra estes também seguiram uma distribuição normal nos dois pontos temporais (T0- $p = 0,56$ ; T2- $p = 0,52$ ), tendo sido registadas as seguintes médias: T0 = 108,18 pg/mL (máximo de 192,73 pg/mL e mínimo de 36,36 pg/mL); T2 = 79,77 pg/mL (máximo de 140,91 pg/mL e mínimo de 36,36 pg/mL).

As diferenças entre as concentrações obtidas nos dois pontos temporais não foram estatisticamente significativa de acordo com o teste T de amostras emparelhadas ( $p=0,56$ ). As diferenças entre os indivíduos GS e GDDA foram calculadas utilizando a equação de Welch e não se mostraram estatisticamente significativas ( $p=0,20$ ).

Gráfico1- Histograma das concentrações de IL-1 $\beta$  (pg/mL) do grupo de indivíduos saudáveis.

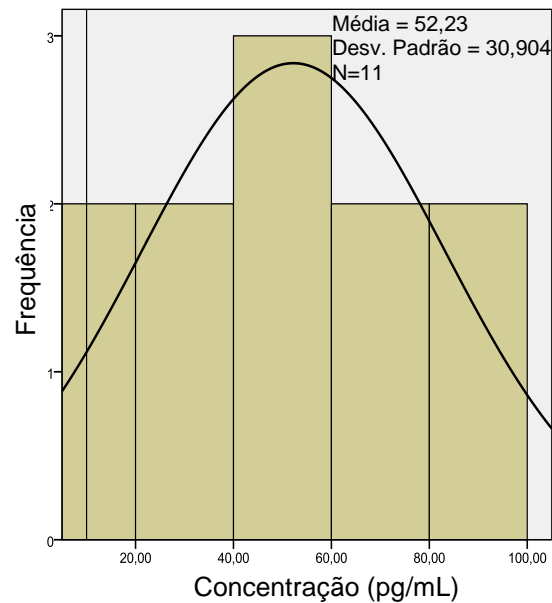


Gráfico 2- Diagrama de caixa relativo às concentrações séricas médias de IL-1 $\beta$  no grupo de doentes com DDA nos diferentes pontos.

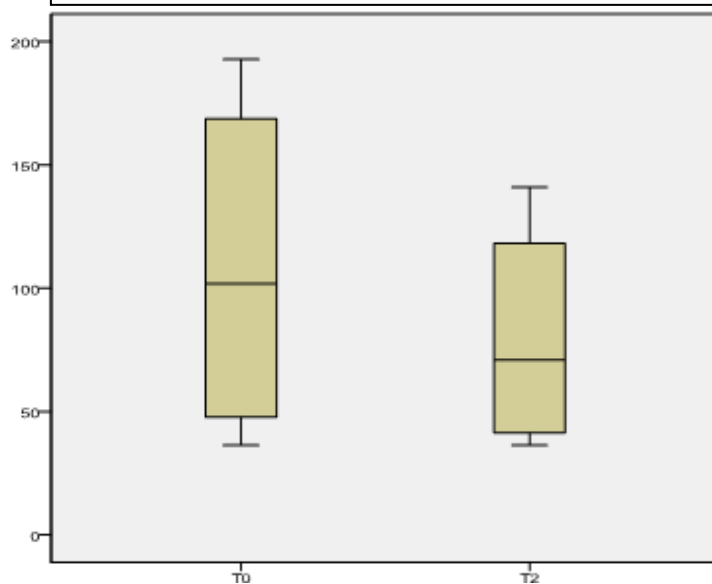
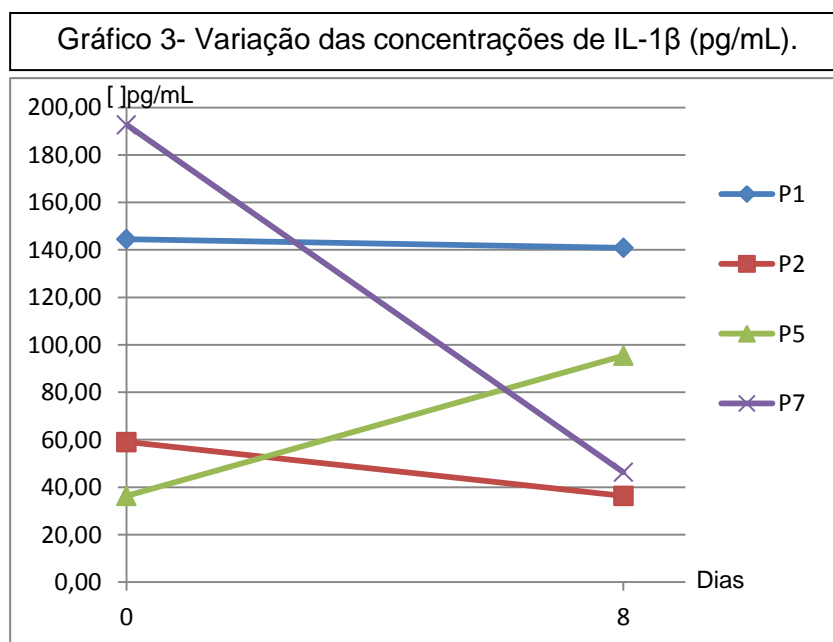


Tabela 10- Variação das concentrações de IL-1 $\beta$  (pg/mL) no grupo de doentes com DDA.

	[IL-1 $\beta$ T2]-[IL-1 $\beta$ T0]
P1	-3,64
P2	-22,73
P5	6,36
P7	-146,36
Média	-41,59



### 2.3 – Opinião dos Proprietários

De acordo com os registos das opiniões dos proprietários, com exceção do doente P5, todos os restantes demonstraram em alguma altura do protocolo uma redução da intensidade de dor, sendo que em 4 casos esta condição se prolongou até ao final do protocolo (23º dia).

A influência da dor na função avaliada pelos proprietários também variou favoravelmente em todos os indivíduos, excepto novamente para o indivíduo P5 no qual não se registou segundo os proprietários nenhuma alteração. Quanto ao parâmetro da qualidade de vida, este foi classificado como tendo sofrido um aumento mais subtil, não se encontrando contudo alterado nos doentes P5 e P6.

**Tabela 11- Opinião dos proprietários em relação a cada paciente nos diferentes pontos temporais**

	Intensidade da dor (mín. 0 - 10 máx.)				Influência da dor na função (mín. 0 - 10 máx.)				Qualidade de vida (mín. 1 - 5 máx.)			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
P1	8	5	4	4	7	4	4	4	2	3	4	3
P2	3	3	2	2	7	4	4	3	3	4	4	4
P3	2	1	1	2	7	6	6	7	3	4	3	3
P4	7	4	5	5	8	6	6	6	2	3	3	3
P5	2	2	2	2	8	8	8	8	2	2	2	2
P6	3	3	2	3	7	7	6	7	3	3	3	3
P7	5	2	1	1	7	5	4	3	3	4	4	4

Gráfico 4- Opinião dos proprietários acerca da intensidade da dor .

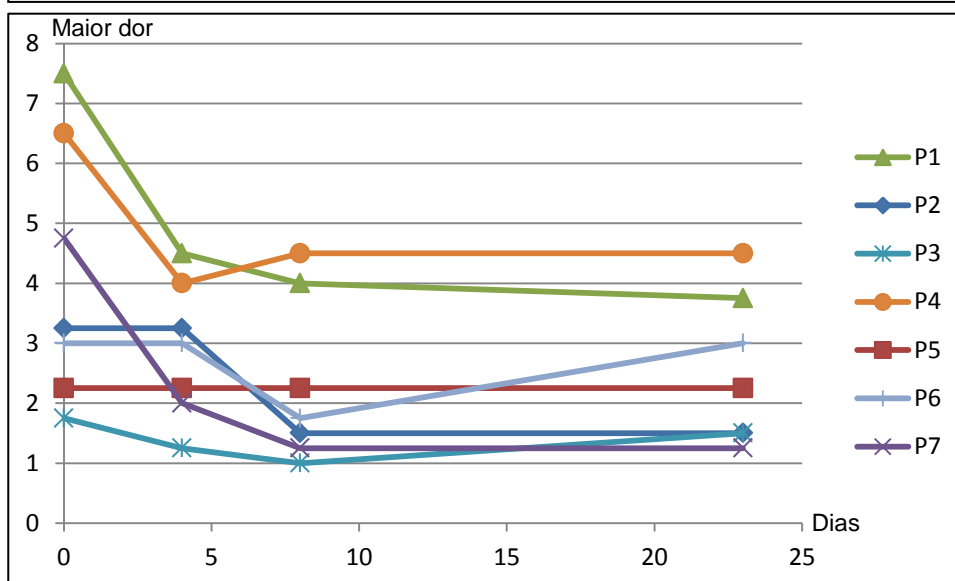
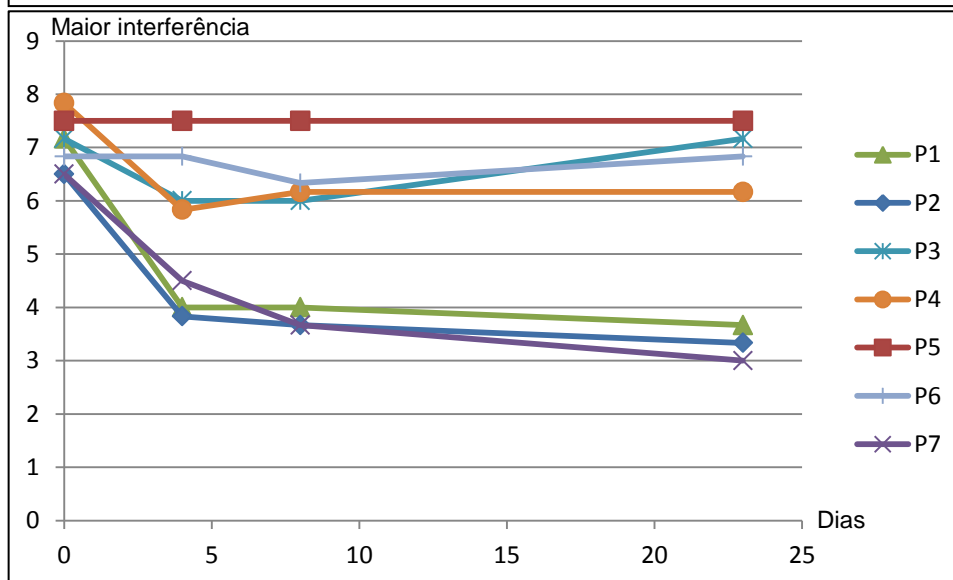


Gráfico 5- Opinião dos proprietários acerca da interferência da dor na função.



## 2.4- Avaliação Clínica

No que respeita à presença de dor durante a manipulação articular, com a exceção do doente P5, todos os restantes indivíduos de GDDA demonstraram uma diminuição deste parâmetro em algum dos tempos do protocolo.

Os indivíduos P1, P2, P3, P4 e P7 apresentaram melhorias logo na primeira reavaliação (T1), enquanto o doente P6 manifestou uma redução da dor à manipulação apenas em T2.

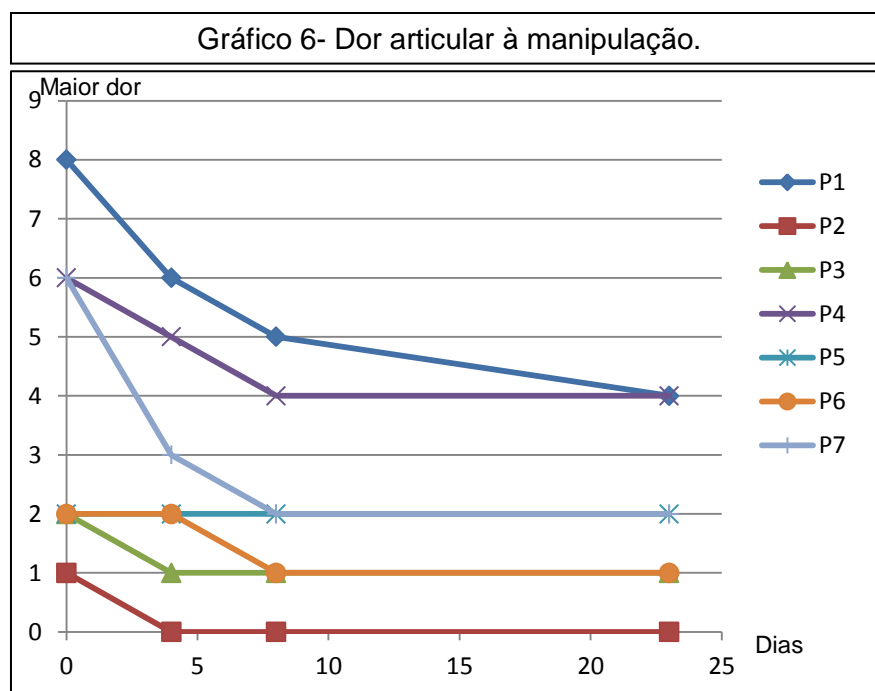
O grau de dor no grupo apresentou uma distribuição normal em todos os momentos considerados (T0:  $p = 0,09$ ; T1:  $p = 0,68$ ; T2:  $p = 0,47$ ; T3:  $p = 0,47$ ). A variação do grau de dor à manipulação entre T0 e T2, e entre T0 e T3 foi estatisticamente significativa de acordo com o teste-t para amostras emparelhadas (T0-T2:  $p=0,02$ ; T0-T3:  $p=0,03$ ).

O coeficiente de correlação de Pearson entre a dor à manipulação articular nos doentes P1, P2, P5, e P7 (os indivíduos com DDA que apresentaram uma concentração de IL-1 $\beta$  acima do limite de detecção de 10pg/mL) e a concentração da IL-1 $\beta$  foi positiva e estatisticamente significativa ( $r=0,84$ ;  $p<0,01$ ).

A avaliação da influência da dor nas funções motoras também melhorou positivamente em todos os indivíduos com exceção dos doentes P5 e P6, onde esta variável se manteve constante. Com base nos relatos dos proprietários e na interação com os indivíduos, foi possível aferir que ocorreram melhorias na qualidade de vida nos doentes P4 e P7.

Tabela 12- Avaliação clínica de cada paciente nos diferentes pontos temporais

	Dor à manipulação (mín. 0 - 10 máx.)				Influência da dor na função (mín. 0 - 10 máx.)				Qualidade de vida (mín. 1 - 5 máx.)			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
P1	8	6	5	4	7	4	4	4	3	3	3	3
P2	1	0	0	0	4	3	3	3	4	4	4	4
P3	2	1	1	1	5	4	4	4	3	3	3	3
P4	6	5	4	5	7	5	5	5	3	4	3	3
P5	2	2	2	2	5	5	5	5	3	3	3	3
P6	2	2	1	1	5	5	5	5	3	3	3	3
P7	6	3	2	2	7	5	4	4	3	4	4	4



A avaliação do coeficiente de concordância entre os parâmetros avaliados pelo corpo clínico e pelos proprietários em cada ponto temporal foi feita com o método de Lin.

**Tabela 13- Correlação de concordância (método de Lin) entre a opinião de proprietários em relação ao nível de dor e a dor à manipulação articular.**

	T0	T1	T2	T3
Pc=	0,914	0,634	0,831	0,768

Apenas em T0 é que se verificou uma concordância moderada ( $P_c > 0,90$ ) entre a opinião dos clínicos em relação à dor à manipulação articular, e a opinião dos proprietários em relação ao nível de dor dos seus animais. Nos restantes pontos temporais a concordância verificada foi fraca.

Gráfico 7- Interferência da dor com a função de acordo com a opinião dos clínicos.

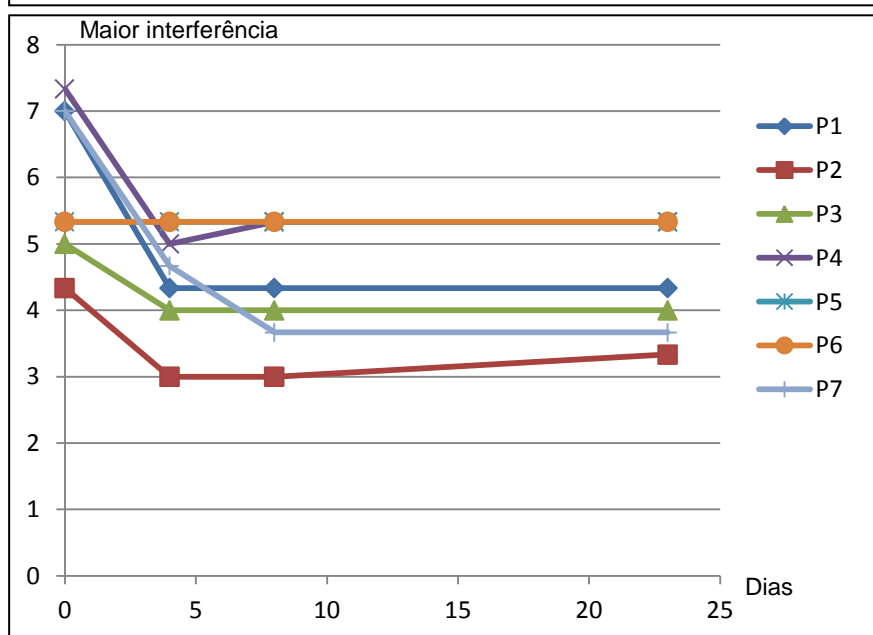


Tabela 14- Correlação de concordância (método de Lin) entre a opinião de proprietários e clínicos em relação à influência da dor na função.

	T0	T1	T2	T3
Pc=	0,046	0,338	0,391	0,373

A concordância verificada entre a opinião de clínicos e proprietários no que respeita à influência da dor na função também foi fraca em todos os pontos temporais.

Tabela 15- Correlação de concordância (método de Lin) entre a opinião de proprietários e clínicos em relação à qualidade de vida.

	T0	T1	T2	T3
Pc=	0,176	0,432	0,432	0,774

De igual modo, a concordância verificada entre a opinião de clínicos e proprietários no que respeita à qualidade de vida dos pacientes, também foi fraca em todos os pontos temporais.



No início do protocolo nenhum dos doentes exibiu uma claudicação do tipo 0 (ausência de claudicação). Ao longo dos momentos considerados no estudo, os doentes P2, P3, P5 e P6 não apresentaram alterações neste parâmetro, ao contrário dos doentes P1, P4 e P7, que revelaram melhorias muito expressivas e que no caso dos indivíduos P1 e P7 se prolongaram até ao final do protocolo.

Tabela 16- Tipo de claudicação apresentado nos diferentes pontos temporais.

	T0	T1	T2	T3	
P1	4	1	1	1	Correspondência: 0- Sem claudicação; 1- Claudicação principalmente a frio; 2- Claudicação principalmente a quente; 3- Claudicação a frio agravada pelo movimento; 4- Claudicação severa constante;
P2	4	4	4	4	
P3	4	4	4	4	
P4	3	3	2	3	
P5	4	4	4	4	
P6	4	4	4	4	
P7	3	1	1	1	

Tabela 17- Avaliação radiográfica de cada paciente (3 avaliadores).

P1										
T0					T1					
	EG	EF	OF	MI	ES	EG	EF	OF	MI	ES
A1	2	2	2	1	1	2	1	2	1	1
A2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1
A3	2	2	2	1	1	2	1	2	1	1

P2										
T0					T1					
	EG	EF	OF	MI	ES	EG	EF	OF	MI	ES
A1	2	2	2	1	1	1	0	1	0	1
A2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	1
A3	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1

P3										
T0					T1					
	EG	EF	OF	MI	ES	EG	EF	OF	MI	ES
A1	3	1	3	2	1	2	0	3	2	1
A2	3	1	3	2	1	2	0	3	2	1
A3	3	0	3	2	1	3	0	3	1	1

P4										
T0					T1					
	EG	EF	OF	MI	ES	EG	EF	OF	MI	ES
A1	3	1	3	2	1	3	0	3	2	1
A2	3	1	3	2	1	3	0	3	2	1
A3	3	0	3	2	1	3	0	3	1	1

P5										
T0					T1					
	EG	EF	OF	MI	ES	EG	EF	OF	MI	ES
A1	3	2	3	2	1	2	0	1	0	0
A2	3	2	3	2	1	3	0	3	2	1
A3	3	1	3	2	1	3	0	3	2	1

P6										
T0					T1					
	EG	EF	OF	MI	ES	EG	EF	OF	MI	ES
A1	3	1	3	2	1	3	0	3	2	1
A2	3	1	3	2	1	3	0	3	2	1
A3	3	1	3	2	1	3	0	3	2	1

P7										
T0					T1					
	EG	EF	OF	MI	ES	EG	EF	OF	MI	ES
A1	2	2	3	2	1	2	1	2	2	1
A2	2	2	3	2	1	2	2	2	2	1
A3	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1

Legenda:

- EG- Estado Geral (0-3);
- EF- Efusão Articular (0-2);
- OF- Osteofitose (0-3);
- MI - Mineralização Intra-articular (0-2)
- ES- Esclerose Subcondral (0-1);

Devido à existência de mais do que 2 avaliadores (que fizeram as suas classificações de modo cego), a concordância entre as diferentes interpretações radiográficas foi calculada pelo método  $\alpha$ -de-Cronbach, tendo-se verificado que foi elevada em T0 ( $\alpha=0,94$ ) e em T3 ( $\alpha=0,92$ ).

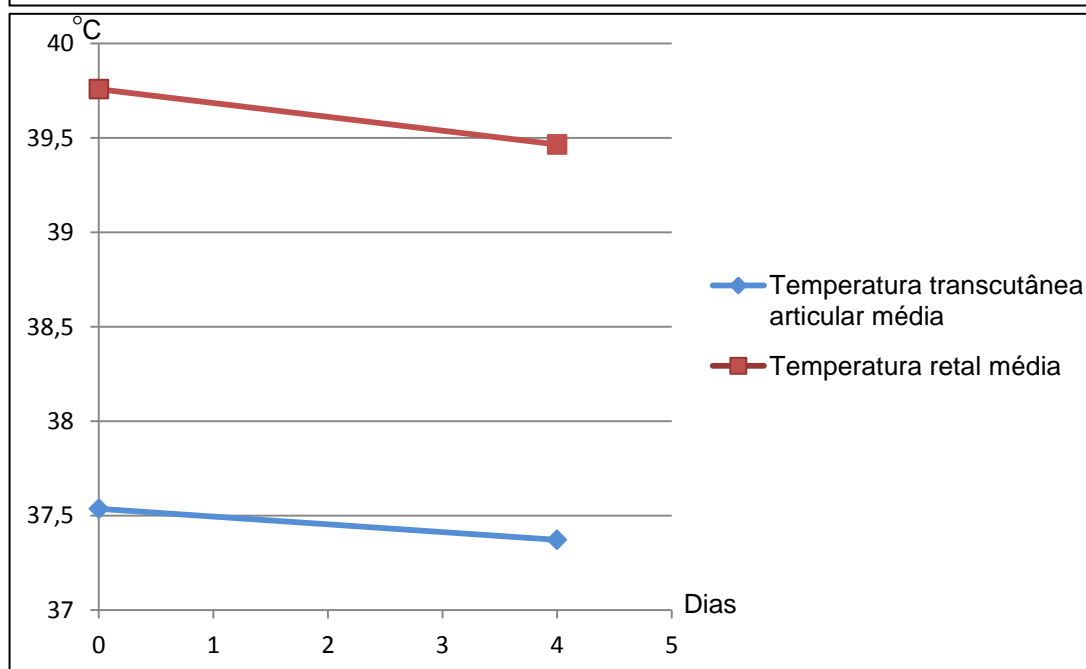
Através do teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras emparelhadas e utilizando como variáveis o conjunto das opiniões dos 3 avaliadores, a efusão articular entre T0 e T3 foi o único dos parâmetros avaliados radiograficamente que teve uma variação estatisticamente significativa ( $p < 0,00$ ).

A temperatura transcutânea articular média dos pacientes foi de 37,56 °C em T0, e 37,37 °C em T1. O conjunto das temperaturas transcutâneas articulares de T0 e de T1 seguiu uma distribuição normal (T0:  $p=0,60$  T1:  $p=0,33$ ) assim como as temperaturas retais (T0:  $p=0,33$ ; T1:  $p=0,67$ ). Através do teste-t para amostras emparelhadas avaliaram-se as diferenças entre as temperaturas transcutâneas articulares medidas em T0 e T1 verificando-se que estas não foram significativas ( $p=0,75$ ), assim como as diferenças da temperatura retal ( $p=0,45$ ).

Tabela 18- Temperatura transcutânea articular e retal nos diferentes pontos temporais (°C).

	T0		T1	
	Transcutânea Articular	Retal	Transcutânea Articular	Retal
P1	37,75	40,95	37,2	41
P2	37	40	36,8	38,2
P3	37,1	39,05	37,65	39,3
P4	38,6	40,3	37,25	39,35
P5	39,15	39,85	37,35	39,4
P6	37	38,7	39,1	40
P7	36,15	39,45	36,25	39

Gráfico 8- Variação das temperaturas transcutânea articular média e temperatura retal média entre T0 e T1 (°C).



### 3- Discussão de Resultados

A média de idades do GDDA (8,7 anos) apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação à do GS (3,9 anos), o que está de acordo com o quadro da prevalência atual da DDA que indica tratar-se de uma condição mais frequente nos indivíduos com idade superior a 4 anos (Innes, 2012; Fox & Millis, 2010b).

Apesar de em algumas espécies animais o Estanozolol já ser utilizado de um modo regular, nomeadamente em equinos enquanto agente dopante (Rinnovati et al., 2015), até esta altura ainda não se encontra definida uma dosagem terapêutica específica. Estudos já foram feitos com a dose 0,5 mg/kg em cavalos por via parentérica intra-muscular (Moeller et al., 2012), e em cães por via oral na dose de 0,3 mg/kg (Adamama-Moraitou et al., 2011) sem que fossem reportados efeitos androgénicos ou alterações secundárias relevantes.

No que respeita à DDA, o Estanozolol já foi utilizado em ovinos na dose de 1mg por articulação (Spadari et al., 2013), em canídeos na dose de 1,5mg por articulação (Carli, 2014) e em equinos nas doses de 1mg, 2,5mg e 5 mg por articulação (Rinnovati et al, 2015). Em todos os trabalhos citados os protocolos visavam administrações intra-articulares semanais do fármaco, ou quinzenais no caso do trabalho de Carli (2014), e as dosagens utilizadas não foram adaptadas a cada paciente com base no seu peso individual. A referência a efeitos secundários adversos associados à artrocentese ou às propriedades do Estanozolol, não foi registada em nenhum dos estudos descritos.

No presente ensaio, a administração do fármaco ocorreu apenas numa única ocasião e utilizando a dose de 0,3mg/kg de modo a considerar as diferentes dimensões dos indivíduos em estudo no cálculo da dosagem a aplicar (com pesos corporais que variaram entre os 20 e os 53kg). A escolha da dose utilizada teve por base a revisão dos trabalhos disponíveis durante o desenho do protocolo experimental, em particular o estudo publicado por Adamama-Moraitou et al. (2011) que à altura do desenho experimental do protocolo, era a única publicação sobre a utilização do Estanozolol na espécie canina. De acordo com os resultados obtidos, nenhum dos 7 indivíduos que receberam a infiltração intra-articular apresentou efeitos anabólicos ou androgénicos sistémicos, à semelhança dos resultados já publicados com a utilização sistémica (Adamama-Moraitou et al. 2013; Moeller et al., 2012) e via infiltrativa intra-articular (Rinnovati et al., 2015; Spadari et al., 2015; Carli 2014; Spadari et al., 2013).

Apenas em T0 foi possível verificar a existência de uma concordância moderada entre a dor à manipulação articular e o nível de dor avaliado pelos proprietários.

Apesar disso, a tendência de variação de cada um dos parâmetros foi a mesma em quase todos os casos e durante todo o protocolo no que respeita à melhoria clínica dos doentes, variando apenas a opinião acerca do grau de melhoria clínica.

A dor à manipulação articular foi considerada como sendo o parâmetro mais fiável para avaliar a dor, por se tratar de um parâmetro específico e que foi aferido apenas por técnicos com formação. A grande maioria dos doentes (6/7) exibiu uma diminuição do nível de dor na articulação infiltrada, e em nenhum deles foi registado o agravamento deste parâmetro em relação à condição apresentada inicialmente.

Nos trabalhos de Spadari et al. (2015) e Carli (2014) alguns pacientes sofreram um agravamento inicial da sintomatologia após a infiltração, exibindo as melhorias clínicas apenas depois desta agudização. Os autores sugeriram um aumento transitório da componente inflamatória da DDA despoletada pelo elevado peso molecular do Estanozolol como a explicação para este fenómeno.

Contudo, no presente trabalho não se verificou a ocorrência do agravamento sintomatológico em nenhuma altura do protocolo.

A variação da dor à manipulação articular entre T0-T2, e entre T0-T3 foi estatisticamente significativa. Estes resultados sugerem a presença de um efeito analgésico por parte do Estanozolol no tratamento da DDA, à semelhança do verificado nos estudos de Rinnovati et al. (2015), Carli, (2014) e Spadari et al. (2013). Esta propriedade pode dever-se ao efeito que o Estanozolol exerce diretamente nos RA, associado também à sua ação anti-catabólica a nível dos receptores glucocorticóides. Em teoria, estes mecanismos são potencialmente capazes de promover a diminuição da síntese de ILs catabólicas, e por consequência estimular a normalização das propriedades do líquido sinovial (Spadari et al., 2015). Talvez por isso nos dois doentes onde o nível de dor em T0 se verificou superior ao dos restantes indivíduos do GDDA (P1 e P7), a componente inflamatória da doença também fosse maior em T0, pelo que os benefícios conseguidos também foram superiores.

De fato, estes dois doentes foram os que apresentaram uma valoração de IL-1 $\beta$  em T0 mais elevada. Outros mecanismos de ação do Estanozolol já identificados e que também podem explicar o alívio sintomático associam-se com o aumento do TGF-1 $\beta$  (Adamma-Moraitou et al., 2009; Falanga et al., 1998), o qual no Homem já foi associado à diminuição da dor articular (Rinnovati et al., 2015), e com a inibição da produção de NO pelos condrócitos (Spadari, et al., 2013) que normalmente participa na potenciação e perpetuação do ciclo catabólico da DDA (Pelletier et al., 2011 Innes, 2012).

Em 5 dos doentes, as melhorias na dor articular à manipulação verificaram-se logo em T1 (4 dias após a infiltração), enquanto um dos indivíduos apenas demonstrou uma evolução positiva em T2 (8 dias após a infiltração). De acordo com a opinião dos clínicos e dos proprietários, apenas um doente (P5) não sofreu alterações quanto ao seu nível de dor durante o tempo do protocolo.

Os indivíduos que inicialmente apresentaram um nível de dor à manipulação articular igual ou superior a um valor de 6, melhoraram no mínimo 2 valores (P4) e no máximo 4 valores (P1 e P7) na mesma escala. Nos restantes doentes as melhorias conseguidas foram apenas de 1 valor (P2, P3 e P6). De acordo com os resultados obtidos, possivelmente os doentes em fase aguda da DDA serão aqueles que beneficiam mais desta modalidade terapêutica no que respeita ao alívio da dor. No final do protocolo, 4 dos doentes ainda mantinham uma diminuição do seu nível de dor à manipulação articular, enquanto em outros 2 se verificou um retorno à condição inicial. Vários fatores podem ter contribuído para a variação heterogénea do nível de dor entre diferentes doentes, como sendo o facto de alguns se encontrarem numa fase mais aguda da DDA, e outros numa fase de aparente quiescência. Nos doentes em fase aguda a componente inflamatória será provavelmente a preponderante no fenómeno da dor (Innes, 2012), contrariamente aos outros onde também poderá estar presente uma componente neuropática, sendo possivelmente este um dos motivos pelo qual os doentes com menor dor (em fase de quiescência) sofreram melhorias mais discretas.

As alterações morfológicas articulares também podem ter condicionado a dinâmica do Estanozolol. Esta relação foi pensada pelo facto de os 2 doentes com maior redução do nível de dor, apresentarem também radiograficamente articulações em melhor estado geral relativamente aos restantes, apesar do nível de dor inicial ser maior.

O tipo de claudicação e as alterações funcionais podem dever-se a sensações álgicas e também às alterações morfológicas articulares, podendo por vezes ser difícil aferir qual dos dois fatores se constitui como o mais limitante. Seria de esperar que uma diminuição da dor se traduzisse obrigatoriamente numa diminuição proporcional da sua influência na função. No entanto, ao longo do protocolo foi possível verificar que a diminuição da dor não se fez acompanhar por uma melhoria da função na mesma ordem de grandeza, o que levanta a hipótese de que a variável dor terá sido sobrevalorizada inicialmente na avaliação das alterações da função. A concordância entre a avaliação da interferência da dor na função, realizada por clínicos e por proprietários foi muito baixa (inferior à verificada entre a dor à manipulação articular e o nível de dor avaliado pelos proprietários), refletindo a diferença entre a consciência de ambos os grupos em relação ao papel das alterações morfológicas na limitação da função.

As alterações dos padrões de claudicação entre os diferentes momentos ou pontos temporais não foram estatisticamente significativas, e a sua variação também não ocorreu de forma linear com a diminuição da dor, possivelmente devido às alterações morfológicas articulares e a fatores variados como a atrofia e contractura muscular em alguns doentes. De facto, dos doentes que mantiveram um padrão de claudicação constante ao longo de todo protocolo (P2, P3, P5 e P6) apenas um (P2), não foi classificado radiograficamente em

T0 pelos diferentes avaliadores como apresentando o nível mais grave na escala de estado geral da articulação.

Dos doentes que no início do protocolo apresentavam um padrão de claudicação constante, apenas um (P1) melhorou neste parâmetro para um quadro de claudicação apenas a frio. Outro doente (P7) que apresentava um padrão de claudicação a frio e que era agravado pelo movimento, também melhorou ao ponto de apenas apresentar claudicação a frio no início da marcha. Estes dois indivíduos foram também os que apresentaram melhorias mais significativas quanto ao nível da dor, o que levanta a hipótese de que nestes casos a dor se assumisse como o fator determinante no tipo de marcha apresentada pelos canídeos, isto até porque radiograficamente foram ambos classificados como apresentando alterações menos graves ou severas, em relação aos outros doentes que tiveram melhorias menos expressivas.

Radiograficamente foi possível constatar que o parâmetro da efusão articular evoluiu favoravelmente entre T0 e T3, e de forma estatisticamente significativa. Esta alteração também corrobora a hipótese de que efeito terapêutico do Estanozolol inclui uma componente anti-inflamatória considerável.

As medições de temperatura utilizando um termómetro de infra-vermelhos foram introduzidas no protocolo com o objectivo de detetar variações na temperatura da articulação, o que poderia traduzir um aumento ou redução da inflamação local. A temperatura retal foi avaliada pelo mesmo método para que os seus valores servissem de controlo para a variação da temperatura articular, já que esta última estará sempre dependente da temperatura corporal. As diferentes dimensões de cada paciente e o seu metabolismo individual poderão ajudar a justificar a difícil padronização da temperatura corporal, mesmo após a sua permanência prévia em sala climatizada à mesma temperatura. Uma vez que a diminuição da temperatura transcutânea articular entre T0 e T1 (4 dias) foi baixa e não significativa, e visto que a média das temperaturas retais nos mesmos tempos sofreu um decréscimo ainda maior, podemos afirmar que neste trabalho não foi possível associar o Estanozolol a um efeito na temperatura articular. Talvez a utilização de um termógrafo tivesse permitido criar essa relação, como já foi demonstrado para outros esteroides por Bird, Ring e Bacon em 1979.

O estudo utilizou um sistema de ELISA específico para a IL-1 $\beta$  canina, estando validado para a quantificação desta citocina em soro e plasma sanguíneo. O GS foi incluído no estudo para permitir a comparação das suas quantificações com as do GDDA, devido à inexistência de valores de referência para a IL-1 $\beta$ . Em 2 doentes as concentrações deste grupo estiveram abaixo do limite de detecção do método de quantificação utilizado (10 pg/mL). Estes resultados não coincidiram com o verificado no trabalho de Prachar, Kaup e Neumann em 2013, onde a concentração sérica de IL-1 $\beta$  num grupo de 16 canídeos

saudáveis só foi detetada em 2 indivíduos, tendo neste caso sido utilizado um método validado para detecção da IL-1 $\beta$  humana e com um limite de detecção mínimo de 1pg/mL. A diferença de resultados poderá estar relacionada com a especificidade dos diferentes sistemas de detecção e quantificação utilizados em ambos os trabalhos.

Apesar das diferenças entre as quantificações de IL-1 $\beta$  no GDDA em T0 e no GS não terem sido estatisticamente significativas, a concentração sérica média dos indivíduos do GS que estiveram acima do limite de detecção (N=11) foi inferior à verificada no GDDA em T0 (N=4) (52,23 pg/mL contra 108,18 pg/mL). No conjunto dos indivíduos do GDDA onde foi possível quantificar a IL-1 $\beta$ , a média das suas concentrações da citocina em T2 tinha descido para valores inferiores aos de T0.

A redução da IL-1 $\beta$  média entre os dias T0 e T2 permite corroborar a hipótese de que o Estanozolol exerce de facto um efeito anti-inflamatório. A correlação positiva verificada entre as concentrações desta IL e a dor à manipulação articular, reforça ainda mais esta hipótese e sugere a existência de uma componente inflamatória significativa na dor. De facto, dos 3 canídeos com maiores níveis de dor à manipulação, 2 deles foram os indivíduos com concentrações de IL-1 $\beta$  superiores (os mesmos que apresentaram melhorias mais expressivas do grupo), enquanto 2 dos que estiveram abaixo do limite de detecção apresentaram os níveis de dor mais baixos.

Conforme o descrito na bibliografia atual em relação à variabilidade da componente inflamatória da DDA (Fox & Millis, 2010b), os resultados obtidos permitiram verificar que 3/7 indivíduos no GDDA apresentaram uma valoração de IL-1 $\beta$  inferior ao limite de detecção, e que outro apresentou em T0 uma valoração inferior à média do GS (P5), sendo que os restantes apresentaram concentrações superiores à média do GS. Os 3 casos que estiveram abaixo do limite de detecção podem ser uma confirmação de que a componente inflamatória pode ser reduzida em alguns indivíduos, e que parte da dor existente poderá ter outras origens como por exemplo a via neuropática. O facto de estes 3 pacientes apresentarem todos uma classificação de gravidade máxima na escala do estado geral da articulação à radiografia, sugere que as células produtoras de IL-1 $\beta$  na articulação (células sinoviais e condrócitos) possam ter sido substituídas por tecido ósseo ou fibroso, e que num contexto mais terminal e arrastado a doença evolua principalmente à custa de outros agentes que não a IL-1 $\beta$  como as MMPs articulares, conforme descrito na bibliografia (Pelletier et al, 2001; Malesud, 2004).

Apenas P5 não seguiu a tendência do resto do grupo, tendo a sua valoração de IL-1 $\beta$  sofrido um ligeiro aumento entre T0 e T2. Conforme tem sido descrito anteriormente, este doente não revelou alterações em nenhum dos parâmetros avaliados com base na opinião dos seus proprietários e dos clínicos, tendo a sua concentração de IL-1 $\beta$  sido a única variável que sofreu alteração. Radiograficamente foi classificado pelos diferentes



avaliadores como apresentando um nível máximo de gravidade para o estado geral da articulação, não permitindo descartar a hipótese de que as suas alterações morfológicas possam estar na origem de alterações na dinâmica do Estanozolol, possivelmente pela substituição dos tecidos funcionalmente capazes de reconhecer e reagir à presença do Estanozolol por tecido ósseo e fibroso. Ainda assim é importante lembrar que a IL-1 $\beta$  é inespecífica da DDA, podendo aumentar na sequência de qualquer alteração de caráter inflamatório ou infeccioso, uma hipótese que não deve ser desconsiderada apesar da monitorização do paciente ao longo do protocolo.

Este estudo apresentado, surge como um estudo piloto no que respeita à avaliação dos efeitos do tratamento intra-articular com fármaco Estanozolol em joelhos de canídeos com DDA, e também na avaliação das diferenças entre as concentrações de IL-1 $\beta$  sérica durante o tratamento. O estudo revelou-se também pioneiro na quantificação desta citocina em canídeos com DDA, utilizando um método validado para esta espécie e para a matriz utilizada (soro sanguíneo). As restrições financeiras representaram logo à partida uma limitação à realização de um protocolo mais prolongado, e também à inclusão de mais indivíduos nos grupos considerados (GDDA e GS). O protocolo foi desenhado de forma a tentar minimizar estas limitações, mas a reduzida amostragem revelou-se impossível de ultrapassar em alguns casos mesmo com a exaustiva avaliação multiparamétrica de cada paciente por clínicos e proprietários. Esta circunstância não permitiu por isso obter resultados estatisticamente significativos para uma população de indivíduos em relação a vários parâmetros avaliados, nomeadamente no que respeita à diminuição da IL-1 $\beta$  após o tratamento com Estanozolol, e às diferenças na concentração da citocina entre canídeos saudáveis e outros com DDA.

Prespectiva-se assim a continuidade do estudo com uma amostragem maior e com um grupo placebo, assim como a possibilidade de realização de várias infiltrações articulares por indivíduo, durante um protocolo mais prolongado, de modo a permitir obter conclusões mais significativas e abrangentes do ponto de vista estatístico, em particular no que respeita à relação entre o tratamento com o Estanozolol e a diminuição da IL-1 $\beta$ , e aos efeitos deste esteróide sobre a morfologia articular.

#### IV- Bibliografia

- Abercromby R., Innes J. & May C. (2006). Arthritis. In J.E.F. Houlton, J.L. Cook, J.F. Innes & S.J. Langley-Hobbs (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Musculoskeletal Disorders*. pp: 81-106. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association
- Adamama-Moraitou, K. K., Pardali, D., Athanasiou, L. V, Prassinos, N. N., Kritsepi, M., & Rallis, T. S. (2011). Conservative management of canine tracheal collapse with stanozolol: a double blinded, placebo control clinical trial. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 24(1), 111–8. BIOLIFE, s.a.s.
- Allan, G. (2002). Radiographic Signs of Joint Disease. In: D.E. Thral (Ed). *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology* (4<sup>th</sup> ed.). pp: . Philadelphia, Pennsylvania: Saunders Elsevier.
- Aughey E. & Frye F. (2001). Connective Tissue. In Comparative Histology with Clinical Correlates. pp: 31-42. London: Manson Publishing Ltd.
- Attur, M., Patel, R., Abramson, S. & Ashkor A. (1997). INTERLEUKIN-17 UP-REGULATION OF NITRIC OXIDE PRODUCTION IN HUMAN OSTEOARTHRITIS CARTILAGE, *Arthritis & Rheumatism* 40(6), 1050–1053. American College of Rheumatology
- Bacha, W.J. & Bacha L.M. (2000). Connective Tissue Proper and Embryonal Connective Tissue. In: *Color Atlas of Veterinary Histology* (2<sup>nd</sup> ed.) pp:13-18. Baltimore, Maryland: Lippincot Williams & Wilkins
- Basaria, S., Wahlstrom, J. T., & Dobs, a S. (2001). Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(11), 5108–5117. The Endocrine Society
- Becerra J., Andrades J., Guerado E., Zamora-Navas P., López-Puertas J. & Reddi H. (2010). Articular Cartilage: Structure and Regeneration. *Tissue Engeneering: Part B*. Vol. 16, Nº6. 617-627. Mary Ann Liebert, Inc.
- Belch J., Madhok R., Mcardle B., Mclaughlin K., Kluft C., Forbes C. & Sturrock R. (1986). The effect of Increasing Fibrinolysis in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Double Blind Study of Stanozolol. In: QJMed, 58(225): 19-27 . Oxford University Press
- Bennett, D. & Taylor D. (1988). Bacterial infective arthritis in the dog, *J Small Anim. Pract.* 29, 207–230. BSAVA
- Bexfield N. & Lee K. (2010). Arthrocentesis. In: *BSAVA Guide to Procedures In Small Animal Practice*. British Small Animal Veterinary Association.
- Bhosale, A. M., & Richardson, J. B. (2008). Articular cartilage. In: structure, injuries and review of management, *British Medical Bulletin* 87: 77–95. Oxford University Press.
- Bird H., Ring E. & Bacon P. (1979). A thermographic and clinical comparison of three intra-articular steroid preparations in rheumatoid arthritis. In: *Annals of the Reumatic Diseases*, 38, pp:36-39

- Bjorkman A., Tulamo R., Salonen H. & Raekallio M. (2009). Evaluating Complementary Therapies for Canine Osteoarthritis Part I : Green-lipped Mussel (*Perna canaliculus*), *Advance Access Publication* 29 365–373.
- Brown, D.C. (2006). *The Canine Brief Pain Inventory*. University of Pennsylvania
- Buckwalter, J.A., Mankin, H.J. & Grodzinsky, A.J. (2005). Articular cartilage and osteoarthritis. *In str Course Lect*, 54, 465-480.
- Budsberg S. (2015). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. In: Handbook of Veterinary Pain Management. 3<sup>a</sup> Ed., Cap.8 pp: 142-158. Mosby, Inc
- Buffington T., Holloway C. & Abood Sarah. (2004). Clinical Dietetics. In: Manual of Veterinary Dietetics. Cap. 5, pp: 120. Saunders Elsevier
- Carneiro, J. & Junqueira, L.C. (2004). *Tecido Conjuntivo* (10<sup>a</sup> edição) pp: 93-120. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Carneiro, J. & Junqueira, L.C. (2004b). *Tecido Cartilagíneo* (10<sup>a</sup> edição) pp: 130-134. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Carli, F. (2014). Efficacia Clinica Dello Stanozololo Intrarticolare Nella Terapia Dell'Osteoartrosi Di Gomito Nel Cane. *DOTTORATO DI RICERCA IN Scienze Veterinarie*. Università di Bologna
- Center, S.A. (2012). Fluid Accumulation Disorders. In: M.D. Willard & H. Tvedten (Eds.) *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* (5<sup>th</sup> ed.). pp: 249-254. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Chikanza I. & Fernandes L. (2000). Novel strategies for the treatment of osteoarthritis. In Pulmonary-Allergy, Dermatological, Gastrointestinal & Arthritis. Exp. Opin. Invest. Drugs. 9(7): 1499-1510
- Colin B. (1997). Diagnostic Imaging of Osteoarthritis. In: Osteoarthritis. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Vol. 27, N°4, pp 777-814
- Creamer, P. (1997). Intra-articular corticosteroid injections in osteoarthritis: do they work and if so, how? *Annals of the Rheumatic Diseases*, 56, 634–636.
- Crow S., Walshaw S. & Boyle J. (2009). Centesis. In: Manual of Clinical Procedures In Dogs, Cats, Rabbits, and Rodents. 3<sup>rd</sup> Ed. Wiley-Blackwell
- Day, T. K., Pepper, W. T., Tobias, T. A. Flynn, M. F., & Clarke, K. M. (1995). Comparison of intra-articular and epidural morphine for analgesia following stifle arthrotomy in dogs. *Veterinary Surgery : VS*, 24(6), 522–530. The American College of Veterinary Surgeons
- Edwards, S. H. R. (2011). Intra-articular drug delivery: The challenge to extend drug residence time within the joint. *The Veterinary Journal*, 190(1), 15–21. . Elsevier Ltd.
- Ellis, a J., Cawston, T. E., & Mackie, E. J. (1994). The differential effects of stanozolol on human skin and synovial fibroblasts in vitro: DNA synthesis and receptor binding. In: *Agents Actions*, 41(1-2), 37–43. Birkhauser Verlag

- Espanha, M.M. (2010), Cartilagem Articular: Estrutura e composição Histoquímica. *Acta Reumatol Port*, 35, 424-433.
- Eurell, J.A.C. (2004). Cartilage. In: *Veterinary Histology*. pp:14-15. Jackson, Wyoming:Teton NewMedia.
- Evans, N. a. (2004). Current Concepts in Anabolic-Androgenic Steroids. *American Journal of Sports Medicine*, 32(2), 534–542. American Orthopaedic Society for Sports Medicine.
- Falanga, V., Greenberg, a. S., Zhou, L., Ochoa, S. M., Roberts, A. B., Falabella, a., & Yamaguchi, Y. (1998). Stimulation of collagen synthesis by the anabolic steroid stanozolol. *Journal of Investigative Dermatology*, 111(6), 1193–1197. The Society for Investigative Dermatology, Inc.
- Farrow S. (2003). Osteoarthritis. In: *Veterinary Diagnostic Imaging: The Dog and Cat*. Vol.1. Mosby, Inc
- Fernandes J.C., Martel-Pelletier J. & Pelletier J.P. (2002). The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. In: J.F. Stoltz (Ed.) *Mechanobiology: Cartilage and Chondrocyte* Vol.2. pp: 238-242. Amsterdam: IOS Press.
- Fernández L., Chirino R., Boada L., Navarro D., Cabrera N., Rio I. & Diaz-Chico B. (1994). Stanozolol and Danazolol, unlike Natural Androgens, Interact with Low Affinity Glucocorticoid-Binding Sites form Male Rat Liver Microsomes. In: *Endocrinology*. Vol.134 No.3. The Endocrine Society
- Fosang A., Last K., Knauper V., Murphy G. & Neame P. (1996). Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13), *FEBS Letters* 380, 17–20. Federation of European Biochemical Societies
- Fox S. (2010). Multimodal Management of Osteoarthritis. In: *Chronic Pain In Small Animal Medicine*. Cap.8, pp:190-200. London: Manson Publishing Ltd
- Fox S. & Millis D. (2010). Pain and Lameness. In *Multimodal Management of Osteoarthritis*. Cap. 1, pp: 5-20. London: Manson Publishing Ltd
- Fox S. & Millis D. (2010b). Osteoarthritis: The disease. In *Multimodal Management of Osteoarthritis*. Cap. 1, pp: 24-29. London: Manson Publishing Ltd
- Fox S. & Millis D. (2010c). Multimodal Management of Canine Osteoarthritis. In *Multimodal Management of Osteoarthritis*. Cap. 1, pp: 31-62. London: Manson Publishing Ltd
- Fox S. & Millis D. (2010d). Physical Rehabilitation in the Treatment of Osteoarthritis. In *Multimodal Management of Osteoarthritis*. Cap. 1, pp: 31-62. London: Manson Publishing Ltd
- Frean, S.P., Abraham, L. a, & Lees, P. (1999). In vitro stimulation of equine articular cartilage proteoglycan synthesis by hyaluronan and carprofen. *Research in Veterinary Science*, 67(2), 183–90. Harcourt Publishers Limited.
- Gartner, L.P. & Hiatt J.L.(2011). Cartilage and Bone. In *Concise Histology*. pp: 74-93 Philadelphia: Saunders Elsevier

- Getty, R. (1982). Sindesmología general (Artrología). In: R. Getty (Ed.), *Sisson y Grossman Anatomía de los animales domesticos* Tomo 1 (5ª Edición) (pp.39-44). Barcelona: Masson S.A.
- Goldring, M.B. (2000). Osteoarthritis and Cartilage : The Role of Cytokines, *Current Rheumatology Reports*. 2:459-463. Current Science Inc.
- Goldring, M. B. (2015). The role of the chondrocyte in osteoarthritis THE ROLE OF THE CHONDROCYTE IN OSTEOARTHRITIS, 0131(August).
- Goldstein, R. E. (2010). Swollen Joints and Lameness. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman Textbook of Veterinary Internal Medicine (7<sup>th</sup> ed.) Volume 1. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Gray, R., Tenenbaum J. & Gottlieb, N. (1981). Local Corticosteroid Injection Treatment in Rheumatic Disorders. In: Seminars in Arthritis and Rheumatism. Vol.X, No.4. Grune & Stratton, Inc.
- Guilak, F. (2011). Best Practice & Research Clinical Rheumatology Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 25(6), 815-823.
- Guilak F. & Hung C. (2005). Physical Regulation of Cartilage Metabolism. In: V.C. Mow & R. Huiskes (Eds.) *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology* (3<sup>rd</sup> ed.) pp: 259-287. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins
- Hanson, P.D. & Maddinson J.E. (2008). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and chondroprotective agents. In: Maddison J. (Ed.). *Small Animal Clinical Pharmacology* (2<sup>nd</sup> ed.). pp: 297-308. Elsevier Limited.
- Hammond R., Macdonald C. & Nicholson A. (2008). Opioid analgesics. In: Maddison J. (Ed.). *Small Animal Clinical Pharmacology* (2<sup>nd</sup> ed.). pp: 309-329. Elsevier Limited.
- Hartgens, F., & Kuipers, H. (2004). Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Medicine*, 34(8), 513-554. Adis Data Information BV.
- Helfman, T., & Falanga, V. (1995). Stanozolol as a novel therapeutic agent in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 33(2), 254–258. The American Academy of Dermatology.
- Henrotin, Y., Sanchez, C., & Balligand, M. (2005). Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: Present and future perspectives. *The Veterinary Journal*, 170(1), 113–123. Elsevier Ltd.
- Hulse, D. (1998). Treatment Methods for Pain in the Osteoarthritic Patient. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 28(2), 361–375. Elsevier
- Innes, J. (1995). Diagnosis and treatment of osteoarthritis in dogs. *Companion Animal Practice* (March) 102-109.
- Innes, J., Costello, M., Barr, F.J., Rudolf, H. & Barr, A. (2004). Radiographic Progression of Osteoarthritis Of the Canine Stifle Joint: A prospective Study. In *Veterinary Radiology & Ultrasound*. Vol. 45, N°2, pp:143-148.

- Innes, J. (2012). Arthritis. In K. M. Tobias & S.A. Johnston(Eds.), *Veterinary Surgery Small Animal*. Vol. 1. pp: 1078-1111. St. Louis, Missouri, Saunders Elsevier.
- Jovanovic, D., Pelletier, J., Alaaeddine N., Mineau F., Geng C. & Ranger P. (1997). Effect of IL-13 on cytokines, cytokine receptors and inhibitors on human osteoarthritis synovium and synovial fibroblasts, *Osteoarthritis and Cartilage* (1997), 40–49. Osteoarthritis Research Society
- Johnston, S., McLaughlin, R. M., & Budsberg, S. C. (2008). Nonsurgical Management of Osteoarthritis in Dogs, *Vet Clin Small Anim* 38, 1449–1470. Elsevier Inc
- Piermattei D., Flo G. & DeCamp C. (2006). Arthrology. In: *Brinker, Piermattei & Flo's Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair* (4<sup>th</sup> ed.) pp: 185-213. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier
- Pope H. & Kanayama G. (2012). Anabolic-Androgenic Steroids. *Drug Abuse and Addiction in Medical Illness: Causes, Consequences and Treatment*, Cap.9, pp:251-264. J.C. Verster et al. (eds.). Springer Science+Business Media, LLC
- Prachar C., Kaup F. & Neumann S. (2013). Interleukin-1 Beta (IL-1 $\beta$ ) in the Peripheral Blood of Dogs as a Possible Marker for the Detection of Early Stages of Inflammation. In: *Open Journal of Veterinary Medicine*, 3, pp: 302-308.
- Kazlauskas, R. (2010). Designer Steroids. In *Doping in Sports*. Handbook of Experimental Pharmacology (Vol. 195), 155-182. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kealy, R. D., Dennis, F., Ballam, J. M., Lust, G., Biery, D. N., Smith, G. K., & Mantz, S. L. (2000). Evaluation of the effect of limited food consumption on radiographic evidence of osteoarthritis in dogs, *14853*, 1678–1680.
- Kevorkian, L., Young, D. A., Darrah, C., Donell, S. T., Shepstone, L., Porter, S., Clark, I. M. (2004). Expression Profiling of Metalloproteinases and Their Inhibitors in Cartilage, *50*(1), 131–141.
- Kicman, a T. (2008). Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology*, *154*(3), 502–521.
- Lee, A. S., Ellman, M. B., Yan, D., Kroin, J. S., Cole, B. J., Wijnen, A. J. Van, & Im, H. (2013). A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene*, 1–8.
- Lin, P. M., Chen, C. C., & Torzilli, P. A. (2004). Increased stromelysin-1 ( MMP-3 ), proteoglycan degradation ( 3B3- and 7D4 ) and collagen damage in cyclically load-injured articular cartilage, 485–496.
- Malemud, C.J. (2004). Cytokines as Therapeutic Targets for Osteoarthritis. In *Novel Therapeutic Strategies*, Vol. 18, pp: 23-35. Springer International Publishing
- Marchevsky, A. M., & Read, R. A. (1997). Bacterial septic arthritis in 19 dogs, *Aust Vet J* Vol. 77 N°4. 233–237.
- Martinez-Sanchis S., Brain P., Salvador A. & Simón V. (1996). Long-Term Chronic Treatment With Stanozolol Lacks Significant Effects on Aggression and Activity in

- Young and Adult Male Laboratory Mice. *Gen. Pharmac.* 27(2), 293–298. Elsevier Science Inc.
- Masonis A. & McCarthy M. (1995). Direct effects of the anabolic/androgenic steroids, stanozolol and 17 $\alpha$ -methyltestosterone, on benzodiazepine binding to the  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor. In: *Neuroscience Letters* 189 (pp 35-38). Elsevier Science Ireland Ltd.
- Masonis A. & McCarthy M. (1996). Effects of the androgenic/anabolic steroid stanozolol on GABAA receptor function: GABA-stimulated <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> influx and [<sup>35</sup>S] TBPS binding. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* vol.279 no.1 186-193. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics
- Mitchell, P. G., Magna, H. A., Reeves, L. M., Lopresti-morrow, L. L., Yocum, S. A., Rosner, P. J., ... Hambor, J. E. (1996). *Cloning , Expression , and Type II Collagenolytic Activity of Matrix Metalloproteinase-13 from Human Osteoarthritic Cartilage*, 97(3), 761–768.
- Morgan R. (2008). Arthrocentesis. *Selected Diagnostic and Therapeutic Procedures*. 5<sup>a</sup>ed., Cap.3, pp 36-37. Saunders Elsevier
- Mottram, D. R., & George, A. J. (2000). Anabolic steroids. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 14(1), 55–69. Harcourt Publishers Ltd.
- Mukundan, G. A. U. R., Patel, R. N., Abramson, S. B., & Amin, A. R. (1997). INTERLEUKIN-17 UP-REGULATION OF NITRIC OXIDE PRODUCTION IN HUMAN OSTEOARTHRITIS CARTILAGE, 40(6), 1050–1053.
- Pearle, A. D., Warren, R. F., & Rodeo, S. A. (2005). Basic Science of Articular Cartilage and Osteoarthritis, 24, 1–12.
- Pelletier, J., Martel-pelletier, J., & Abramson, S. B. (2001). Osteoarthritis , an Inflammatory Disease Potential Implication for the Selection of New Therapeutic Targets, 44(6), 1237–1247.
- Pelletier, J., Martel-pelletier, J., Ghandur-mnaymneh, L., Howell, D. S., & Woessner, J. F. (1998) ROLE OF SYNOVIAL MEMBRANE INFLAMMATION IN CARTILAGE MATRIX BREAKDOWN IN THE POND-NUKI DOG MODEL OF OSTEOARTHRITIS.
- Plumb DC., (2008). Stanozolol. In: *Plumb's veterinary drug handbook*, 5th ed. (pp.834 835) Blackwell Publishing Ames
- Plumb DC. (2008b). Boldenone. In: *Plumb's veterinary drug handbook*, 5<sup>th</sup> ed. (pp.106-107) Blackwell Publishing Ames
- Qvistgaard, E., Christensen, R., Torp-Pedersen, S., & Bliddal, H. (2006). Intra-articular treatment of hip osteoarthritis: a randomized trial of hyaluronic acid, corticosteroid, and isotonic saline. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(2), 163–170.
- Reece W.O. (2005). Bones, Joints and Synovial Fluid. In: *Functional Anatomy and Physiology of Domestic animals* (3<sup>rd</sup> ed.) pp: 147-168. Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins

- Rinnovati, R., Romagnoli, N., & Spadari, A. (2015). Dose-Finding Study for Intraarticular Treatment With Stanozolol in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 1, 1–5.
- Rizkalla G., Reiner A., Bogoch E. & Poole R.(1992). Studies of the Articular Cartilage Proteoglycan Aggrecan in Health and Osteoarthritis-Evidence for Molecular Heterogeneity and Extensive Molecular Changes in Disease, Vol 90 (December), 2268–2277. The American Society of Clinical Investigation.
- Ross, M.H. & Pawlina W.(2011). Connective Tissue . *In Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology* (6<sup>th</sup> ed.) pp:158-178. Lippincott Williams & Wilkins
- Ross, M.H. & Pawlina W.(2011b). Cartilage. *In Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology* (6<sup>th</sup> ed.) pp:198-207. Lippincott Williams & Wilkins
- Sandell, L. J., & Aigner, T. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis An introduction : Cell biology of osteoarthritis.
- Schoone, G. J., Carreta, P., Varejão, E., Benthem, B. Van, Afonso, M. O., Alves-pires, C., Schallig, H. D. F. H. (2004). Sero-epidemiological study of canine Leishmania spp . infection in the municipality of Alijó ( Alto Douro , Portugal ), 121, 21–32.
- Shahidi, N. T. (2001). A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clinical Therapeutics*, 23(9), 1355–1390.
- Schulz K.S. (2013). Diseases of the Joints. In: T.W. Fossum (Ed.), *Small Animal Surgery* (4<sup>th</sup> ed.). pp: 1215-1238. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Smith, J. W., Piercy, E. A., Smith, J. W., & Piercy, E. A. (2014). STATE-OF-THE-ART Infectious Arthritis, 20(2), 225–230. Oxford University Press.
- Soma, L. R., Uboh, C. E., Guan, F., McDonnell, S., & Pack, J. (2007). Pharmacokinetics of boldenone and stanozolol and the results of quantification of anabolic and androgenic steroids in race horses and nonrace horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30(2). Blackwell Publishing Ltd
- Spadari, A., Rinnovati, R., Babbini, S., & Romagnoli, N. (2015). Clinical Evaluation of Intra-articular Administration of Stanozolol to Manage Lameness Associated With Acute and Chronic Osteoarthritis in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(2), 105–110. doi:10.1016/j.jevs.2014.12.003
- Spadari, A., Romagnoli, N., Predieri, P. G., Borghetti, P., Cantoni, A. M., & Corradi, A. (2013). Research in Veterinary Science Effects of intraarticular treatment with stanozolol on synovial membrane and cartilage in an ovine model of osteoarthritis. *Research in Veterinary Science*, 94(3), 379–387.
- Symons, J. A., Wong, W. L., Palladino, M. A. & Duff, G. W. (1992). Interleukin 8 in Rheumatoid and Osteoarthritis, 92–94.
- Tartaglia, L. & Waugh, A. (2005). Joints. In *Veterinary Physiology and Applied Anatomy. A textbook for veterinary nurses and technicians*. pp: 88-91. Butterworth-Heinemann: Elsevier.



- Taylor, S. (2009). Joint Disorders. In: R.W. Nelson & C.G. Couto (Eds.) *Small Animal Internal Medicine* (4<sup>th</sup> Ed.) pp: 1127- 1141. Missouri: Mosby Elsevier
- Todhunter, R. (2006). Surgical Biology of Joints. In J.E.F. Houlton, J.L. Cook, J.F. Innes & S.J. Langley-Hobbs (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Musculoskeletal Disorders*. pp: 144-150. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association
- Uthman I., Raynauld J., & Haraoui B. (2003). Intra-articular therapy in osteoarthritis. In: *Postgrad Med J*; 79 pp: 449-45
- Vilar J., Morales M., Santana A., Spinella G., Rubio M., Cuervo B., Cugat R. & Carrilo J. (2013). Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. In: *BMC Veterinary Research* 9:131
- Watts, G. T., Baddeley, M. R., Wellings, R., & Evans, J. (1965). The Nature of Wound Healing: Experimental Tensile Strength Studies with Deca Durabolin and S35\*. *Annals of Surgery*, 5–8.
- Weese, J.S. & Fulford M. (2011). Parasitic Diseases. In: *Companion Animal Zoonoses* pp:40-45 . Iowa: Blackwell Publishing Ltd
- Weisbrode S. (2009). Doenças das Articulações. In: M.D. McGavin & J.F. Zachary (Eds.). *Bases da Patologia em Veterinária*. Tradução da 4<sup>a</sup> ed. pp: 1094-1104. São Paulo: Elsevier Editora Ltda.
- Whitehouse, M. W. I., Macrides, T. A., Kalafatis, N., Betts, W. H., Haynes, D. R., & Broadbent, J. (1997). Anti- Inflammatory Activity of a Lipid Fraction (Lyprinol) from the Green-Lipped Mussel, *Inflammopharmacology* 237–246. Kluwer Academic Publishers.
- Wilson, J. D. (1988). Androgen abuse by athletes. *Endocrine Reviews*, 9(2), 181–199. The Endocrine Society
- Wiese A. & Yaksh T. (2015). Nociception and Pain Mechanisms. Physiology and Patophysiology of Pain: In: *Handbook of Veterinary Pain Management*, 2<sup>a</sup> Ed., Cap.2, Parte 1 pp: 10-14. Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc.
- Wood, J. a., Chung, D.-J., Park, S. A., Zwingenberger, A. L., Reilly, C. M., Ly, I., ... Murphy, C. J. (2012). Periocular and Intra-Articular Injection of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: An *In Vivo* Imaging and Migration Study. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 28(3), 307–317.
- Yuan, X. (2005). Detection of designer steroids. *Nuclear Receptor Signaling*, 3. 1–5.
- Zajac A.M. & Conboy G.A. (2006). Blood Parasites of Dogs and Cats. In: *Veterinary Clinical Parasitology* (7<sup>th</sup> ed.) pp: 168-169. Iowa: Blackwell Publishing
- Zhu S., Li Y., Ma H., Pan S., Chen H. & DU M, (2009). Stanozolol activates the cross-talk of estrogen receptor alpha-insulin-like growth factor-1 receptor-extracellular-signal regulated kinase 1/2 in the growth plate chondrocytes of estrogen-inhibited adolescent rats in vitro. *Zhonghua Er Ke Za Zhi. Chinese Journal of Pediatrics* 47(10):774-8.



## V- Anexos

**Anexo 1-** Estatística descritiva da casuística acompanhada durante o estágio curricular no Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis, Barreiro (Set.2014 – Mar. 2015).

Gráfico 9- Frequência Relativa de Casuística de Patologia Médica, Cirúrgica e Medicina Preventiva.

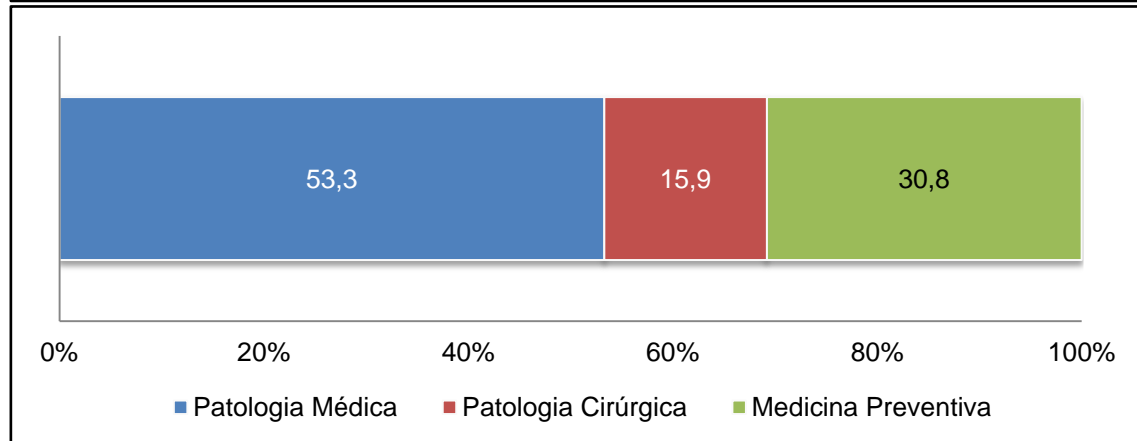


Gráfico 10- Frequência Relativa de Casuística de Patologia Médica, Cirúrgica e Medicina Preventiva.

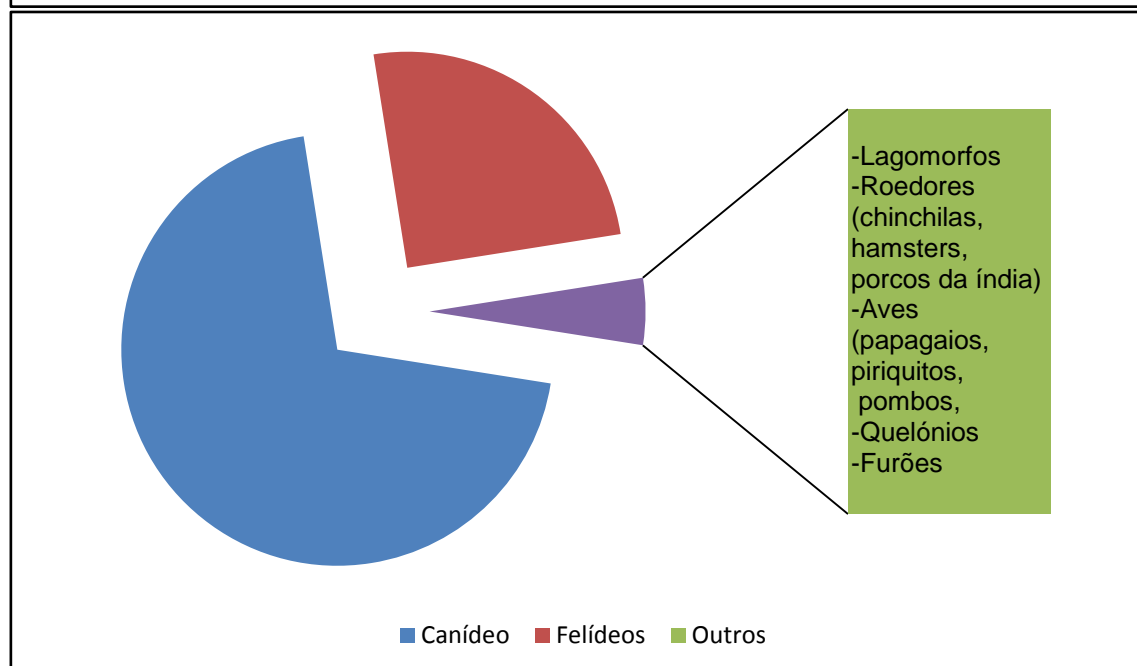


Gráfico 11- Frequência Relativa de Espécies na Casuística de Medicina Interna, Patologia Cirúrgica e Medicina preventiva (%).

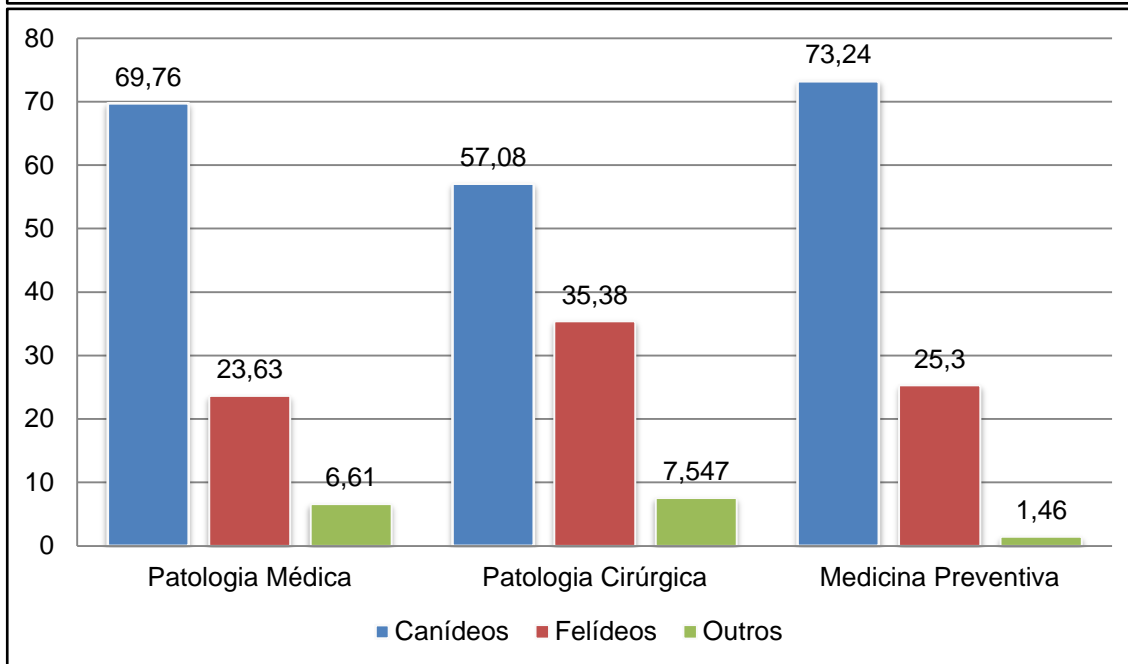


Gráfico 12- Frequência Relativa de Espécies nas Diferentes Áreas da Patologia Médica.

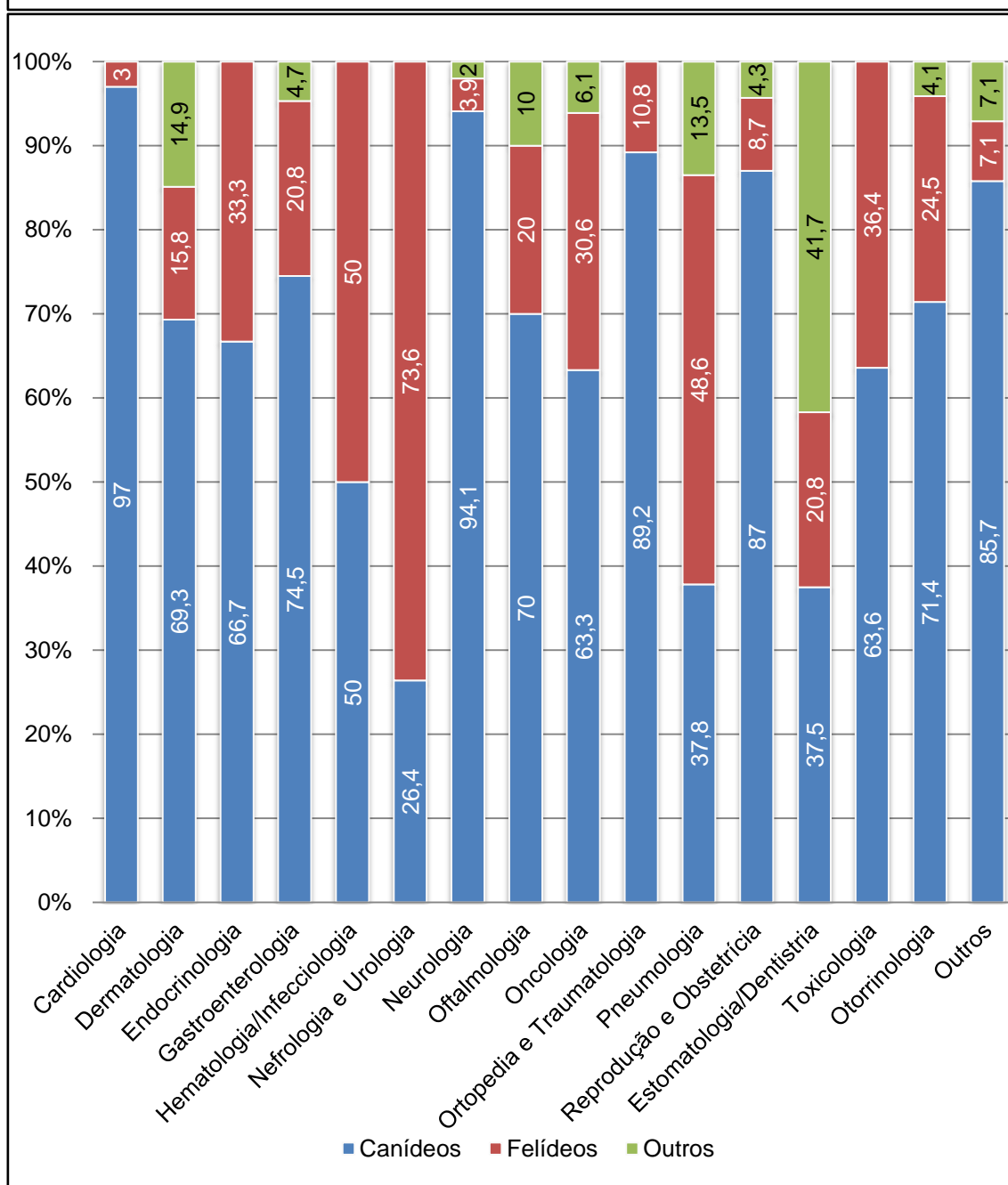


Gráfico 13- Frequência Relativa das Diferentes Espécies de Pacientes na Casuística de Patologia Cirúrgica-

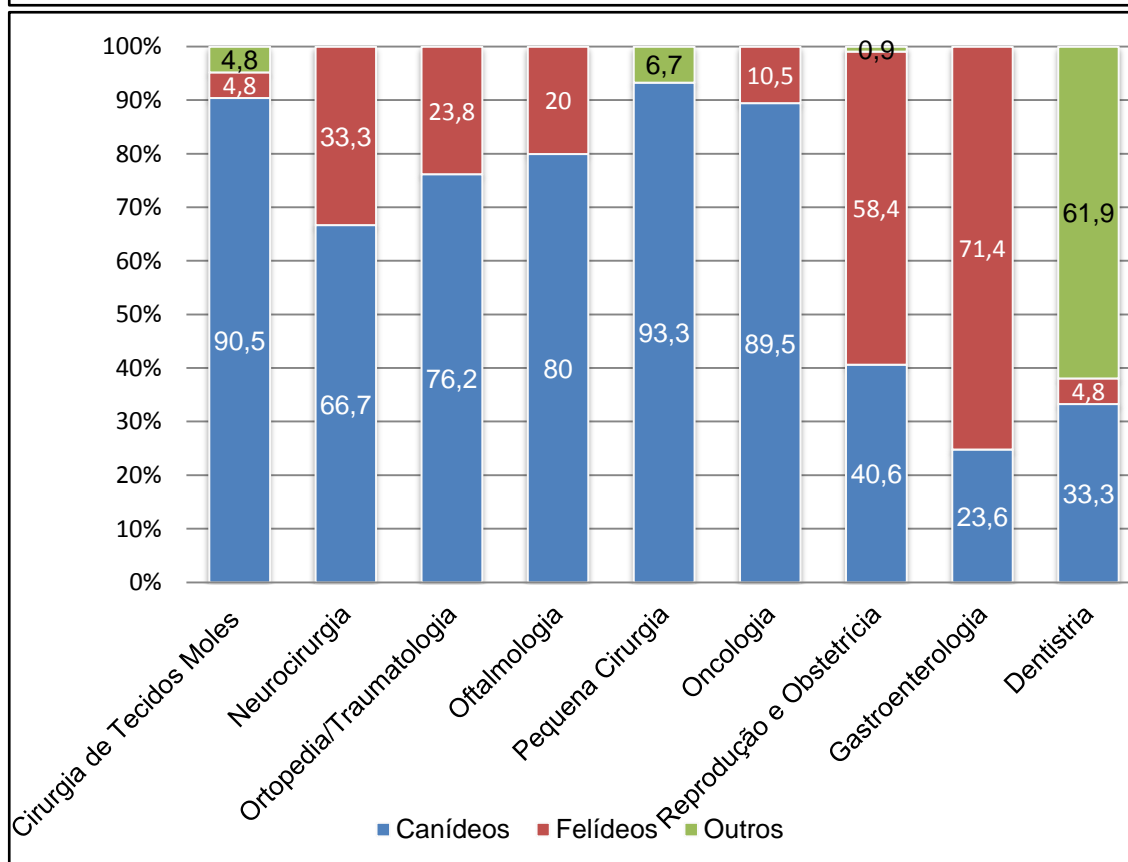


Gráfico 14- Frequência Relativa das Diferentes Espécies de Pacientes pela Casuística de Medicina preventiva (%).

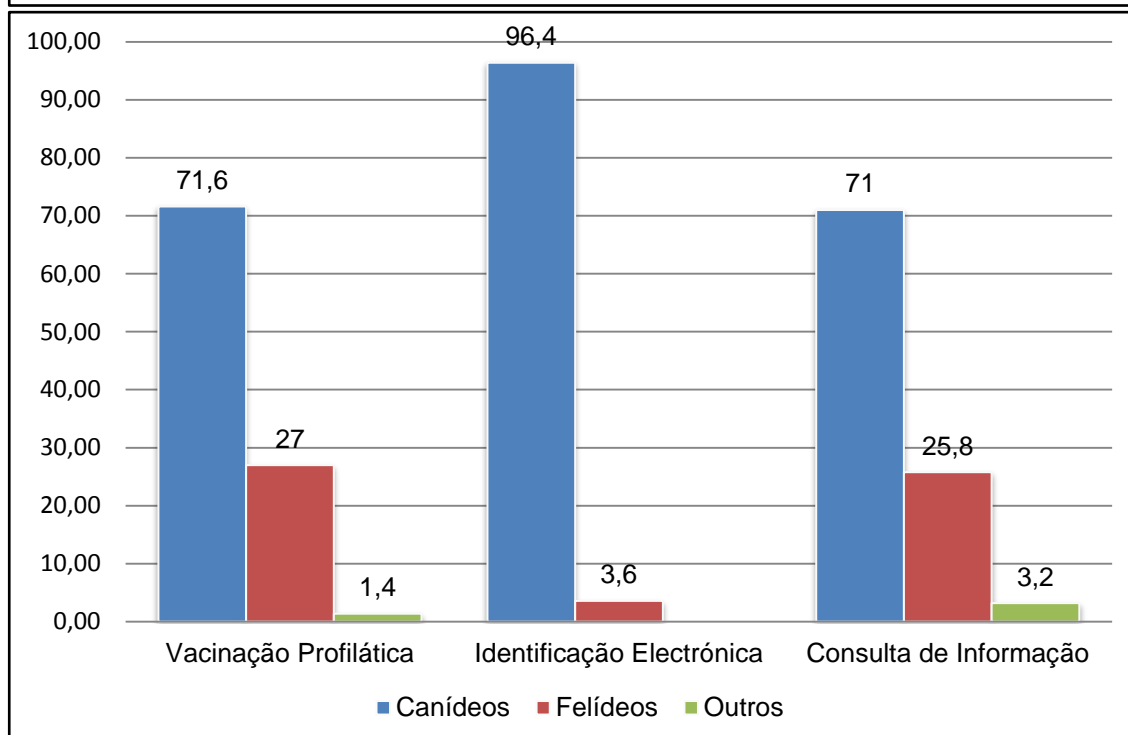
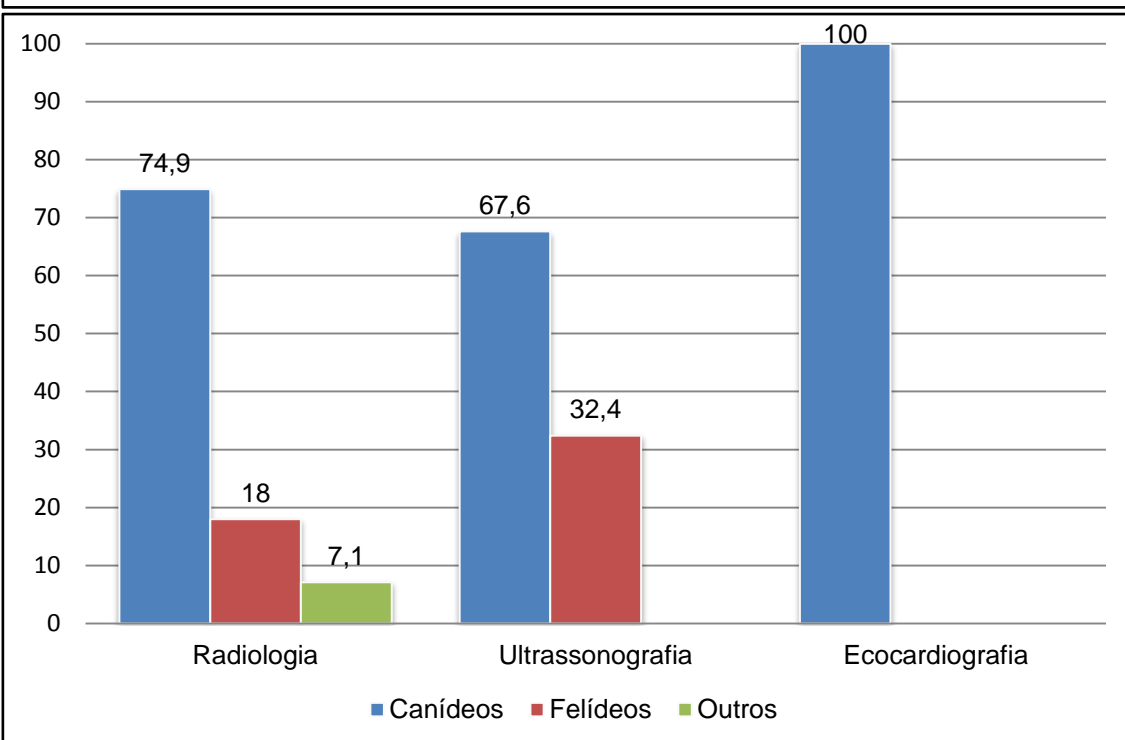


Gráfico 15- Frequência Relativa das Diferentes Espécies de Pacientes na Casuística de Imagiologia (%).







**Anexo 2** – Formulários utilizados para o registo de pacientes durante o ensaio clínico assim como das variáveis em estudo e a opinião dos proprietários.

<b>Registo de indivíduos no grupo de canídeos com DDA (GDDA)</b>									
<b>Nome do Proprietário:</b>					<b>Nome do Doente:</b>				
<b>Espécie</b>	<b>C</b>	<b>F</b>	<b>Género:</b>	<b>F</b>	<b>M</b>	<b>Idade:</b>	<b>Raça:</b>	<b>Data: / /</b>	
:									
<b>Peso:</b>		<b>Kg</b>		<b>Articulação Nº:</b>					
T0 = dia da administração			T1 = 4º dia		T2 = 8º dia		T3=23º dia		
<b>Articulação em estudo</b>					<b>Medicação de base</b>				
<b>Cotovelo</b>		ODto	OEsq	1)		4)			
<b>Joelho</b>		ODto	OEsq	2)		5)			
				3)		6)			
<b>Doenças de base</b>									
1)			2)			3)			
<b>Tempo</b>		<b>Temperatura retal</b>			<b>Temperatura transcutânea articular</b>				
<b>T0</b>		°C			<b>T0</b>		°C		
<b>T1</b>		°C			<b>T1</b>		°C		

<b>Valor de IL-1β sérica</b>
<b>T1</b>
<b>T2</b>

<b>Avaliação das Alterações Radiográficas</b>										
	T0					T3				
<b>Severidade global das alterações</b>	O0(min)	O1	O2	O3	(max)	O0(min)	O1	O2	O3	(max)
<b>Efusão articular</b>	O0(min)	O1	O2	(max)		O0(min)	O1	O2	(max)	
<b>Osteófitose</b>	O0(min)	O1	O2	O3	(max)	O0(min)	O1	O2	O3	(max)
<b>Mineralização intra-articular</b>	O0(min)	O1	O2	(max)		O0(min)	O1	O2	(max)	
<b>Esclerose subcondral</b>	O0(min)	O1	(max)			O0(min)	O1	(max)		

**1- Tipo de claudicação**

<b>T0</b>	○0 Ausente	○1 Início a frio	○2 Início a quente	○3 Início a frio, amplificação durante a marcha	○4 Constante
<b>T1</b>	○0 Ausente	○1 Início a frio	○2 Início a quente	○3 Início a frio, amplificação durante a marcha	○4 Constante
<b>T2</b>	○0 Ausente	○1 Início a frio	○2 Início a quente	○3 Início a frio, amplificação durante a marcha	○4 Constante
<b>T3</b>	○0 Ausente	○1 Início a frio	○2 Início a quente	○3 Início a frio, amplificação durante a marcha	○4 Constante

**2- Preencha o espaço junto do número que melhor descreve a dor à manipulação neste instante.**

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Ausência de dor					Dor Intensa					
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Ausência de dor					Dor Intensa					
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Ausência de dor					Dor Intensa					
<b>T3</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Ausência de dor					Dor Intensa					

**3- Em que grau a dor interfere com a capacidade do paciente se posicionar de pé após o decúbito?**

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Não interfere					Interfere completamente					
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Não interfere					Interfere completamente					
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Não interfere					Interfere completamente					
<b>T3</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Não interfere					Interfere completamente					

**4- Em que grau a dor interfere com a capacidade do paciente caminhar?**

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Não interfere					Interfere completamente					
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Não interfere					Interfere completamente					
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Não interfere					Interfere completamente					
<b>T3</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Não interfere					Interfere completamente					

**5- Em que grau a dor interfere com a capacidade do paciente correr?**

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Não interfere					Interfere completamente					
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Não interfere					Interfere completamente					
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Não interfere					Interfere completamente					
<b>T3</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
	Não interfere					Interfere completamente					

**6- Como classifica a qualidade de vida atual do paciente?**

<b>T0</b>	<input type="radio"/> Fraca	<input type="radio"/> Razoável	<input type="radio"/> Boa	<input type="radio"/> Muito Boa	<input type="radio"/> Excelente
<b>T1</b>	<input type="radio"/> Fraca	<input type="radio"/> Razoável	<input type="radio"/> Boa	<input type="radio"/> Muito Boa	<input type="radio"/> Excelente
<b>T2</b>	<input type="radio"/> Fraca	<input type="radio"/> Razoável	<input type="radio"/> Boa	<input type="radio"/> Muito Boa	<input type="radio"/> Excelente
<b>T3</b>	<input type="radio"/> Fraca	<input type="radio"/> Razoável	<input type="radio"/> Boa	<input type="radio"/> Muito Boa	<input type="radio"/> Excelente

## Questionário para Avaliação da Dor e Qualidade de Vida de Canídeos por Proprietários

(Traduzido e Adaptado de Canine Brief Pain Inventory - University of Pennsylvania, School of Veterinary Medicine)

### Descrição da dor

Classifique a dor do seu cão:

1. Preencha o espaço junto do número que melhor descreve a **maior** dor durante os últimos 7 dias.

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa
<b>T3</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa

2. Preencha o espaço junto do número que melhor descreve a **menor** dor durante os últimos 7 dias.

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa
<b>T3</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa

3. Preencha o espaço junto do número que melhor descreve o nível **médio** de dor durante os últimos 7 dias.

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa
<b>T3</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa

4. Preencha o espaço junto do número que melhor descreve a dor neste instante.

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa
<b>T3</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Ausência de dor											Dor Intensa

### Descrição da função:

Relativamente ao seu cão, preencha o espaço junto do número que melhor descreve a forma como durante os últimos 7 dias a sua **dor interferiu** com:

#### **5. Actividade Global**

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T3</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		

#### **6. Apreciação da vida**

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T3</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		

#### **7. Capacidade de se posicionar de pé após o decúbito**

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T3</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		

#### **8. Capacidade de caminhar**

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T3</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		

#### **9. Capacidade de correr**

<b>T0</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T1</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		
<b>T2</b>	<input type="radio"/> 0	<input type="radio"/> 1	<input type="radio"/> 2	<input type="radio"/> 3	<input type="radio"/> 4	<input type="radio"/> 5	<input type="radio"/> 6	<input type="radio"/> 7	<input type="radio"/> 8	<input type="radio"/> 9	<input type="radio"/> 10
Não interferiu									Interferiu completamente		

T3	o0	o1	o2	o3	o4	o5	o6	o7	o8	o9	o10
Não interferiu											Interferiu completamente

## 10. Capacidade para subir escadas, passeios, degraus, etc.

T0	o0	o1	o2	o3	o4	o5	o6	o7	o8	o9	o10
Não interferiu						Interferiu completamente					

T1	o0	o1	o2	o3	o4	o5	o6	o7	o8	o9	o10
Não interferiu											Interferiu completamente

T2	o0	o1	o2	o3	o4	o5	o6	o7	o8	o9	o10
Não interferiu											Interferiu completamente

T3	o0	o1	o2	o3	o4	o5	o6	o7	o8	o9	o10
	Não interferiu				Interferiu completamente						

### Apreciação Global

**11.** Preencha o espaço junto do número que melhor descreve a qualidade de vida do seu cão durante os últimos 7 dias.

Caso durante os últimos 7 dias:					
T0	<input type="radio"/> Fraca	<input type="radio"/> Razoável	<input type="radio"/> Boa	<input type="radio"/> Muito Boa	<input type="radio"/> Excelente
T1	<input type="radio"/> Fraca	<input type="radio"/> Razoável	<input type="radio"/> Boa	<input type="radio"/> Muito Boa	<input type="radio"/> Excelente
T2	<input type="radio"/> Fraca	<input type="radio"/> Razoável	<input type="radio"/> Boa	<input type="radio"/> Muito Boa	<input type="radio"/> Excelente
T3	<input type="radio"/> Fraca	<input type="radio"/> Razoável	<input type="radio"/> Boa	<input type="radio"/> Muito Boa	<input type="radio"/> Excelente

## *Canine Brief Pain Inventory*

### **Description of pain:**

Rate your dog's pain:

1. Fill in the oval next to the one number that best describes the pain at its **worst** in the last 7 days.

☐ 0   ☐ 1   ☐ 2   ☐ 3   ☐ 4   ☐ 5   ☐ 6   ☐ 7   ☐ 8   ☐ 9   ☐ 10

No pain

Extreme pain

2. Fill in the oval next to the one number that best describes the pain at its **least** in the last 7 days

☐ 0   ☐ 1   ☐ 2   ☐ 3   ☐ 4   ☐ 5   ☐ 6   ☐ 7   ☐ 8   ☐ 9   ☐ 10

No pain

Extreme pain

3. Fill in the oval next to the one number that best describes the pain at its **average** in the last 7 days.

☐ 0   ☐ 1   ☐ 2   ☐ 3   ☐ 4   ☐ 5   ☐ 6   ☐ 7   ☐ 8   ☐ 9   ☐ 10

No pain

Extreme pain

4. Fill in the oval next to the one number that best describes the pain as it is **right now**.

☐ 0   ☐ 1   ☐ 2   ☐ 3   ☐ 4   ☐ 5   ☐ 6   ☐ 7   ☐ 8   ☐ 9   ☐ 10

No pain

Extreme pain

### **Description of function:**

Fill in the oval next to the one number that best describes how during the last 7 days **pain** has **interfered** with your dog's:

5. **General Activity**

☐ 0   ☐ 1   ☐ 2   ☐ 3   ☐ 4   ☐ 5   ☐ 6   ☐ 7   ☐ 8   ☐ 9   ☐ 10

Does not interfere

Completely interferes

6. **Enjoyment of Life**

☐ 0   ☐ 1   ☐ 2   ☐ 3   ☐ 4   ☐ 5   ☐ 6   ☐ 7   ☐ 8   ☐ 9   ☐ 10

Does not interfere

Completely interferes

7. **Ability to Rise to Standing From Lying Down**

☐ 0   ☐ 1   ☐ 2   ☐ 3   ☐ 4   ☐ 5   ☐ 6   ☐ 7   ☐ 8   ☐ 9   ☐ 10

***Brief Pain Inventory, con't***

**8. Ability to Walk**

☐ 0   ☐ 1   ☐ 2   ☐ 3   ☐ 4   ☐ 5   ☐ 6   ☐ 7   ☐ 8   ☐ 9   ☐ 10  
Does not interfere Completely interferes

**9. Ability to Run**

☐ 0   ☐ 1   ☐ 2   ☐ 3   ☐ 4   ☐ 5   ☐ 6   ☐ 7   ☐ 8   ☐ 9   ☐ 10  
Does not interfere Completely interferes

**10. Ability to Climb Stairs, Curbs, Doorsteps, etc.**

☐ 0   ☐ 1   ☐ 2   ☐ 3   ☐ 4   ☐ 5   ☐ 6   ☐ 7   ☐ 8   ☐ 9   ☐ 10  
Does not interfere Completely interferes

**Overall impression:**

11. Fill in the oval next to the one number that best describes your dog's overall quality of life over the last 7 days.

☐ Poor   ☐ Fair   ☐ Good   ☐ Very Good   ☐ Excellent

**Anexo 3 – Protocolo e bula do sistema ELISA utilizado no estudo para a quantificação da Interleucina-1 $\beta$ .**

**SIGMA-ALDRICH™**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

**Certificate of Analysis**

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA  
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757

**Product Name** Canine IL1B / Interleukin-1 beta ELISA Kit  
for serum, plasma, and cell culture supernatants  
**Product Number** RAB0572  
**Lot Number** Sample0606

**Storage**

Store the kit at -20°C. It remains active for up to 1 year. Avoid repeated freeze-thaw cycles. The reconstituted standard should be stored at -20°C or -70°C (-70°C is recommended). Opened microplate strips or reagents may be stored for up to 1 month at 2-8°C. Return unused wells to the pouch containing desiccant pack and reseal along entire edge.

**Components**

1. Canine IL-1 beta Antibody-coated ELISA Plate (Item A) - RAB0572A-1EA-KC: 96 wells (12 strips x 8 wells) coated with anti-Canine IL-1 beta.
2. 20x Wash Buffer (Item B) - RABWASH4
3. Lyophilized Canine IL-1 beta Protein Standard (Item C) - RAB0572-1VL-KC
4. Biotinylated Canine IL-1 beta Detection Antibody (Item F) - RAB0572F-1VL-KC
5. HRP-Streptavidin (Item G) - RABHRP5
6. ELISA Colorimetric TMB Reagent (HRP Substrate, Item H) - RABTMB3
7. ELISA Stop Solution (Item I) - RABSTOP3
8. ELISA 5x Assay/Sample Diluent Buffer (Item E2) - RABELADE-15ML

**Assay/Sample Diluent Buffer dilution  
(Preparation, Step 2)**

Assay/Sample Diluent Buffer (Item E2) should be diluted 5-fold with deionized or distilled water before use.

**Sample Dilution  
(Preparation, Step 3)**

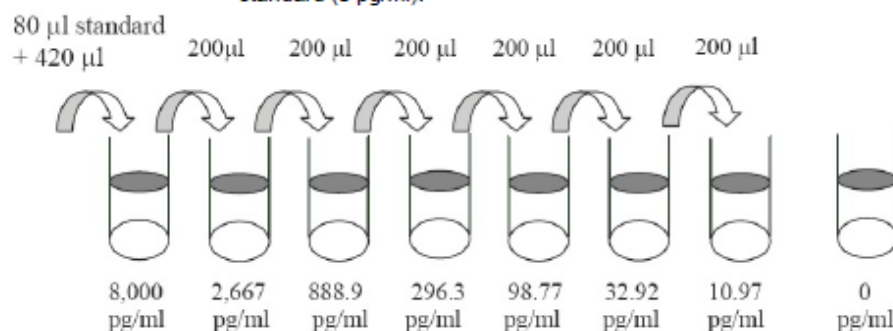
1x Assay/Sample Diluent Buffer (Item E2) should be used for dilution of serum, plasma, and cell culture supernatant samples. The suggested dilution for normal serum/plasma is 2 fold.

\* Please note that the levels of IL-1 beta may vary between different samples. Optimal dilution factors for each sample must be determined by the investigator.



**Preparation of Standard  
(Preparation, Step 4)**

Briefly spin a vial of Item C. Add 400  $\mu$ l 1X Assay Diluent (Item E2) into Item C vial to prepare a 50 ng/ml standard solution. Dissolve the powder thoroughly by a gentle mix. Add 80  $\mu$ l of the IL-1 beta standard solution from the vial of Item C, into a tube with 420  $\mu$ l 1X Assay Diluent to prepare a 8,000 pg/ml standard solution. Pipette 400  $\mu$ l 1X Assay Diluent into each tube. Use the 8,000 pg/ml standard solution to produce a dilution series (Figure 1). Mix each tube thoroughly before the next transfer. 1X Assay Diluent serves as the zero standard (0 pg/ml).



**Preparation of Biotinylated  
Detection Antibody  
(Preparation, Step 6)**

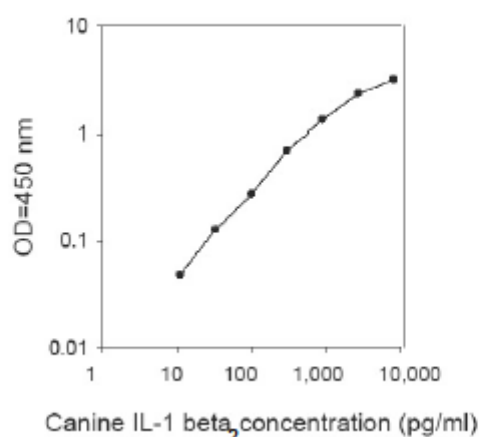
Briefly spin the Detection Antibody vial (Item F) before use. Add 100  $\mu$ l of 1x Diluent Buffer (Item E2) into the vial to prepare a detection antibody concentrate. Pipette up and down to mix gently (the concentrate can be stored at 4°C for 5 days). The detection antibody concentrate should be diluted 80-fold with 1x Diluent Buffer (Item E2) and used in Procedure, step 4.

**Dilution of HRP-Streptavidin  
Concentrate  
(Preparation, Step 7)**

Briefly spin the HRP-Streptavidin concentrate vial (Item G) and pipette up and down to mix gently before use, as precipitates may form during storage. HRP-Streptavidin concentrate should be diluted 500-fold with 1x Diluent Buffer (Item E2).

For example: Briefly spin the vial (Item G) and pipette up and down to mix gently. Add 20  $\mu$ l of HRP-Streptavidin concentrate into a tube with 10 ml 1X Assay Diluent to prepare a 500-fold diluted HRP-Streptavidin solution (don't store the diluted solution for next day use). Mix well.

**Typical Data**



**Sensitivity** The minimum detectable dose of Canine IL-1 beta was determined to be 10 pg/mL.  
Minimum detectable dose is defined as the analyte concentration resulting in an absorbance that is 2 standard deviations higher than that of the blank (diluent buffer).

**Recovery** Recovery was determined by spiking various levels of Canine IL-1 beta into the sample types listed below. Mean recoveries are as follows:

Sample Type	Average % Recovery	Range (%)
Serum	86.02	74-98
Plasma	84.08	68-107
Cell culture media	126.1	109-145

#### LINEARITY

Sample Type	Serum	Plasma	Cell Culture Media
1:2 Average % of Expected Range (%)	135.9 128-144	126.8 120-131	112.9 105-121
1:4 Average % of Expected Range (%)	140.3 132-148	135.2 114-148	107.7 92-123

**Intra-Assay Reproducibility** CV < 10%

**Inter-Assay Reproducibility** CV < 12%

**Specificity** This ELISA pair antibody detects Canine IL-1 beta. Other species not determined.

This certificate is system generated and does not require a signature

Product of USA, MSDS available

For R&D use only. Not for drug, household or other uses.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich Publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use.

Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip

## Product Information

### ELISA Kit Information

Storage Temperature -20 °C

## TECHNICAL BULLETIN

### Product Description

This ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kit is an *in vitro* enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative measurement of a target protein in biological samples, such as serum, plasma, cell culture supernatants, urine, and/or cell and tissue lysates (see current Certificate of Analysis for validated sample types). This assay employs a specific capture antibody coated on a 96 well plate. Standards and samples are pipetted into the wells and the target protein present in a sample is bound to the wells by the immobilized antibody. The wells are washed and a biotinylated detection antibody specific for the target protein is added. After washing away unbound biotinylated antibody, HRP-conjugated streptavidin is pipetted to the wells. The wells are again washed, a TMB substrate solution is added to the wells and color develops in proportion to the amount of target protein bound. The Stop Solution changes the color from blue to yellow, and the intensity of the color is measured at 450 nm.

### Components

1. Antibody-coated ELISA Plate (Item A) - 96 wells (12 strips x 8 wells) coated with specific capture antibody.
2. 20x Wash Buffer (Item B) – RABWASH4: 25 ml of 20x concentrated solution.
3. Target Protein Standard (Item C) - 2 vials, recombinant protein.
4. Assay/Sample Diluent Buffer/s: See current Certificate of Analysis
5. Biotinylated Detection Antibody (Item F) 2 vials of biotinylated detection antibody (each vial is enough to assay half a microplate).
6. HRP-Streptavidin (Item G) – RABHRP5: 200 µl of concentrated HRP-conjugated streptavidin.
7. ELISA Colorimetric TMB Reagent (HRP Substrate, Item H) – RABTMB3: 12 ml of 3, 3', 5, 5'-tetra-methylbenzidine (TMB) in buffer solution.
8. ELISA Stop Solution (Item I) – RABSTOP3: 8 ml of 0.2 M sulfuric acid.

### Reagents and Equipment Required but Not Provided.

1. Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm.
2. Precision pipettes to deliver 2 µl to 1 ml volumes.
3. Adjustable 1-25 ml pipettes for reagent preparation.
4. 100 ml and 1 liter graduated cylinders.
5. Absorbent paper.
6. Distilled or deionized water.
7. SigmaPlot® software (or other software which can perform four-parameter logistic regression models).
8. Tubes to prepare standard or sample dilutions.

### Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

### Preparation Instructions

1. Bring all reagents and samples to room temperature (18–25 °C) before use.
2. Assay/Sample Diluent Buffer dilution: See current Certificate of Analysis for dilution instructions.
3. Sample dilution: See current Certificate of Analysis for dilution instructions and recommendations.  
Note: Levels of the target protein may vary between different specimens. Optimal dilution factors for each sample must be determined by the investigator.
4. Preparation of target protein standards: See current Certificate of Analysis for dilution instructions.
5. If the Wash Buffer (20x) (Item B) contains visible crystals, warm to room temperature and mix gently until dissolved. Dilute 20 ml of Wash Buffer concentrate into deionized or distilled water to yield 400 ml of 1x Wash Buffer.

6. Preparation of Biotinylated Detection Antibody: See current Certificate of Analysis for dilution instructions.
7. Dilution of HRP-Streptavidin concentrate (Item G): See current Certificate of Analysis for dilution instructions.

#### **Storage/Stability**

Store the kit at  $-20^{\circ}\text{C}$ . It remains active for up to 1 year. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

The reconstituted standard should be stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  or  $-70^{\circ}\text{C}$  ( $-70^{\circ}\text{C}$  is recommended). Opened microplate strips or reagents may be stored for up to 1 month at  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Return unused wells to the pouch containing desiccant pack and reseal along entire edge.

#### **Procedure**

1. Bring all reagents and samples to room temperature ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) before use. It is recommended that all standards and samples be run at least in duplicate.
2. Add  $100\ \mu\text{l}$  of each standard (see Preparation, step 4) and sample into appropriate wells. Cover wells and incubate for 2.5 hours at room temperature or overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with gentle shaking.
3. Discard the solution and wash 4 times with 1x Wash Solution. Wash by filling each well with Wash Buffer ( $300\ \mu\text{l}$ ) using a multichannel pipette or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
4. Add  $100\ \mu\text{l}$  of 1x prepared Biotinylated Detection Antibody (see Preparation, step 6) to each well. Incubate for 1 hour at room temperature with gentle shaking.
5. Discard the solution. Repeat the wash as in step 3.
6. Add  $100\ \mu\text{l}$  of prepared HRP-Streptavidin solution (see Preparation, step 7) to each well. Incubate for 45 minutes at room temperature with gentle shaking.
7. Discard the solution. Repeat the wash as in step 3.
8. Add  $100\ \mu\text{l}$  of ELISA Colorimetric TMB Reagent (Item H) to each well. Incubate for 30 minutes at room temperature in the dark with gentle shaking.
9. Add  $50\ \mu\text{l}$  of Stop Solution (Item I) to each well. Read at  $450\ \text{nm}$  immediately.

#### **Results**

##### Calculations

Calculate the mean absorbance for each set of duplicate standards, controls, and samples, and subtract the average zero standard optical density. Plot the standard curve using SigmaPlot software, with standard concentration on the x-axis and absorbance on the y-axis. Draw the best-fit curve through the standard points.

**Appendix**  
**Troubleshooting Guide**

Problem	Cause	Solution
Poor standard curve	Inaccurate pipetting	Check pipettes
	Improper standard dilution	Ensure a brief spin of Item C and dissolve the powder thoroughly with gentle mixing.
Low signal	Too brief incubation times	Ensure sufficient incubation time; Procedure, step 2 may change to overnight
	Inadequate reagent volumes or improper dilution	Check pipettes and ensure correct preparation
Large CV	Inaccurate pipetting	Check pipettes
High background	Plate is insufficiently washed	Review the manual for proper wash. If using a plate washer, check that all ports are unobstructed.
	Contaminated wash buffer	Make fresh wash buffer
Low sensitivity	Improper storage of the ELISA kit	Store the standard at $\leq -20^{\circ}\text{C}$ after reconstitution, others at $4^{\circ}\text{C}$ . Keep substrate solution protected from light
	Stop solution	Stop solution should be added to each well before measurement.

SigmaPlot is a registered trademark of Jandel Scientific.

ANK,KCP,CH,MAM 04/14-1

©2014 Sigma-Aldrich Co. LLC. All rights reserved. SIGMA-ALDRICH is a trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC, registered in the US and other countries. Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see product information on the Sigma-Aldrich website at [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) and/or on the reverse side of the invoice or packing slip.